

**INFLUÊNCIA CLÍNICA E TECIDUAL DO DIAZEPAM
NO PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO DURANTE
O MOVIMENTO ORTODÔNTICO**

DÉBORA CRISTINA BATISTA DE PAIVA

CD

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Maria Bolognese, CD

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Ortodontia).

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro de Moraes Mendes, CD

Prof. Dr. José Nelson Mucha, CD

Prof^a. Dr^a. Maria Evangelina Monnerat, CD

RIO DE JANEIRO

2001

Ficha Catalográfica

PAIVA, Débora Cristina Batista de

Influência clínica e tecidual do diazepam no periodonto de sustentação durante o movimento ortodôntico. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2001.

xix, f. 209

Tese: Mestrado em Odontologia (Ortodontia)

1. Movimento ortodôntico

2. Diazepam

3. Periodonto de sustentação

4. Teses

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia

II. Título

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo,
à sombra do Onipotente descansará.

Direi do Senhor:

Ele é o meu refúgio e a minha fortaleza,
o meu Deus, em quem confio”.

Salmo 91: 1 e 2.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Deus Todo-Poderoso,
por sua graça e misericórdia;

Aos meus pais,
Otávio e Abelina (*in memoriam*),
pela educação a mim proporcionada e pela compreensão, incentivo e
sustento dispensados durante toda a minha formação profissional;

Ao meu irmão,
Luiz,
pelo carinho e ajuda;

À minha querida amiga-irmã,
Ana Claudia,
que nos momentos mais difíceis do curso sustentou-me com seu
incentivo, companheirismo e orações.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Maria Bolognese, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia – Ortodontia (Mestrado e Doutorado), da Faculdade de Odontologia da UFRJ, pelo incentivo e orientação precisa durante todos os momentos da realização desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Carlos de Souza Telles, pelos ensinamentos e experiências de vida transmitidos durante o curso, que contribuíram para minha formação profissional.

À Professora Doutora Maria Evangelina Monnerat, pelo exemplo de dedicação profissional e ensinamentos transmitidos desde o curso de graduação.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFRJ, Dr. Alderico Artese, Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas, Dr. Eduardo Franzotti, Dra. Flávia Artese, Dr. José Fernando Stangler Brazzalle, Dr. Lincoln Nojima, Dra. Margareth Maria Gomes de Souza, Dra. Mônica Tirré de Souza Araújo e Dra. Teresa Cristina Moreira, em reconhecimento pelos conhecimentos transmitidos.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da UFF que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Professor Doutor Orlando Chevitarese, pelo exemplo de vida dedicada à pesquisa em Odontologia.

Ao Doutor José Wilson Miguel de Albuquerque, Diretor do Biotério de Experimentação Animal do Instituto Vital Brazil, pela concessão dos animais utilizados na pesquisa, além de todo suporte fornecido.

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto de Biofísica do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, especialmente à Noêmia Rodrigues pela disposição, apoio e auxílio no preparo das peças destinadas à microscopia eletrônica e realização das eletromicrografias.

À Professora Doutora Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da UFRJ, pela amizade, apoio e cessão dos microscópios utilizados para a realização das fotomicrografias.

Aos meus familiares e amigos que compreenderam meu ideal. Obrigado pela confiança e estímulo.

Aos funcionários da UFRJ Rosinha, Mônica, Cristina, Vanda, Vanilda, Vera, Waltencir, Robson, Luís, Sylvana, Arminda, Francisco, pela amizade, ajuda e atenção dispensadas.

Aos colegas de turma, Célia, Carla, Luciana, Margarida, Marcelo, Ledimar, Leandro e Celso, pelos momentos compartilhados.

Aos colegas contemporâneos de curso, Ana Claudia, Elisa, Maura, Leandro, Gérson, Georgiana, Carla, Edson, João, Priscila, Luciana, Queila, Andréia Stuari, Andréia Becker, Paulo, Damico e Columbano, pelos momentos agradáveis durante o curso.

Ao Sr. Hélio Soares, pela gentileza e boa vontade na impressão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

PAIVA, Débora Cristina Batista de. **Influência clínica e tecidual do diazepam no periodonto de sustentação durante o movimento ortodôntico**. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bolognese. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2001, 209p., Tese (Mestrado em Ortodontia).

Foram avaliados os efeitos do diazepam, potente inibidor da hidrólise do AMP cíclico (AMPc), nas reações teciduais associadas ao movimento dentário ortodôntico. Existem evidências de que o AMPc exerce importante papel como mediador intracelular do remodelamento ósseo induzido pela pressão mecânica. A amostra consistiu de 36 cobaias (*Cavia porcellus*), com 9 semanas de vida, pesando entre 400 a 450g e divididos em grupo **controle**, **placebo** e **experimental**. Foram injetados 2,5mg/Kg de diazepam pela via intraperitoneal, a cada 12 horas, nos animais do grupo **experimental**. Os animais dos grupos **placebo** e **experimental**, submetidos à movimentação ortodôntica,

foram sacrificados 3, 7 e 14 dias após a aplicação da força. O dispositivo ortodôntico foi confeccionado com fio da liga titânio molibdênio com 0.016" de diâmetro, no qual foi incorporado mola helicoidal liberando 25g/f. Verificou-se que o diazepam afetou o remodelamento ósseo, aumentando em 70% a extensão do movimento dentário, porém com absorção radicular. Expressivas alterações teciduais caracterizadas pelo aumento no tamanho dos osteoclastos, infiltração de macrófagos, danos às demais células do periodonto e desorganização das fibras do ligamento também foram vistas no grupo **experimental**.

SUMMARY

PAIVA, Débora Cristina Batista de. **Influência clínica e tecidual do diazepam no periodonto de sustentação durante o movimento ortodôntico**. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bolognese. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2001, 209p., Tese (Mestrado em Ortodontia).

There were evaluated the effect of diazepam, a potent inhibitor of the cyclic AMP (cAMP) hydrolysis, on the tissue reactions related to orthodontic tooth movement. There is evidence suggesting that cAMP plays an important role as intracellular mediator of bone remodeling induced by mechanical stress. The sample consisted of thirty-six guinea pigs (*Cavia porcellus*), 9 weeks of age, ranging in weight from 400 to 450g, divided into **control** group, **placebo** group and **experimental** group. In the concentration of 2,5mg/Kg, diazepam was injected intraperitoneally every 12 hours to the **experimental** group. The animals of the **placebo** and **experimental** groups, submitted to orthodontic

movement, were sacrificed at 3, 7 and 14 days after the application of orthodontic force. The appliance was made with a 0.016" titanium molybdenum alloy wire formed into helical springs delivering 25g/f. It was verified that diazepam affected bone remodeling, increasing in 70% the extension of the dental movement, but with root resorption. Marked tissue alterations characterized by large osteoclasts, macrophagic infiltration, damage to the other periodontal cells and disorganization of the ligament fibers were also seen in the **experimental** group.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do modelo animal utilizado na pesquisa.....	81
Figura 2	Fotografia de um animal do grupo experimental sob efeito do diazepam.....	85
Figura 3	Fotografia da embalagem comercial da liga titânio-molibdênio utilizada na confecção do dispositivo ortodôntico.....	87
Figura 4	Ilustrações fotográficas do dispositivo após a confecção	87
Figura 5	Seqüência fotográfica da montagem do dispositivo ortodôntico.....	90
Figura 6	Ilustração fotográfica dos planos de secção das cabeças das cobaias.....	93
Figura 7	Eletromicrografias (MEV) da superfície do cimento acelular. Grupo controle e placebo	112
Figura 8	Eletromicrografias (MEV) das superfícies radiculares dos incisivos das cobaias. Grupo experimental	113
Figura 9	Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo controle	115
Figura 10	Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo placebo no 3º dia após aplicação da força. Lado de pressão e tração.....	119
Figura 11	Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo placebo no 7º dia após	

	aplicação da força. Lado de pressão e tração.....	120
Figura 12	Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo placebo no 14º dia após aplicação da força. Lado de pressão e tração.....	121
Figura 13	Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo experimental no 3º dia após aplicação da força. Lado de pressão e tração.....	124
Figura 14	Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo experimental no 7º dia após aplicação da força. Lado de pressão e tração.....	125
Figura 15	Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo experimental no 14º dia após aplicação da força. Lado de pressão.....	127
Figura 16	Fotomicrografias (ML) do grupo experimental no 14º dia após aplicação da força. Lado de tração.....	128
Figura 17	Eletromicrografias (MET) referentes ao grupo controle ..	139
Figura 18	Eletromicrografias (MET) referentes ao grupo controle ..	140
Figura 19	Eletromicrografias (MET) referentes ao grupo controle ..	141
Figura 20	Eletromicrografias (MET) do grupo placebo . Lado de pressão.....	142
Figura 21	Eletromicrografias (MET) do grupo placebo . Lado de tração.....	143
Figura 22	Eletromicrografias (MET) do grupo placebo Lado de tração.....	144
Figura 23	Eletromicrografias (MET) do grupo experimental . Lado de pressão.....	145
Figura 24	Eletromicrografias (MET) do grupo experimental . Lado de pressão e tração.....	146
Figura 25	Eletromicrografias (MET) do grupo experimental . Lado de tração.....	147
Figura 26	Eletromicrografias (MET) do grupo experimental . Lado de tração.....	148
Figura 27	Fotografias do 14º dia mostrando a separação dentária..	154

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparação do peso médio em gramas durante o período do experimento, entre os grupos placebo e experimental	104
Gráfico 2	Representação gráfica da taxa de movimentação dentária em milímetros (mm) por dia nos grupos placebo e experimental	109
Gráfico 3	Histograma demonstrativo do movimento dentário em milímetros (mm) por dia para os grupos placebo e experimental	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais benzodiazepínicos de aplicação clínica.....	72
Quadro 2	Quantidade de animais utilizados por grupo, aplicação do medicamento e tempo de sacrifício em dias.....	84

LISTA DE SIGLAS

Å	-	Angstrom
ADP	-	Adenosina difosfato
5'-AMP	-	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	-	Adenosina 3' 5'-monofosfato cíclico
ATP	-	Trifosfato de adenosina
ATPase	-	Adenosina trifosfatase
Ca ²⁺	-	Íon cálcio
CO ₂	-	Dióxido de carbono
COX	-	Cicloxygenase
COX-1	-	Cicloxygenase 1
COX-2	-	Cicloxygenase 2
CSF	-	Fator estimulador de colônia
DAG	-	1,2 Diacilglicerol
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
1,25 DHCC	-	1,25-diidroxicolecalciferol
EGF	-	Fator de crescimento ectodérmico
g	-	Grama
g/f	-	Grama/força
GABA	-	Ácido gama-aminobutírico
G-CSF	-	Fator estimulador de colônia granulocítica
GM-CSF	-	Fator estimulador da colônia monocítica-macrofágica
GMPc	-	Guanosina 3' 5'-monofosfato cíclico

H ⁺	-	Íon hidrogênio
HE	-	Hematoxilina e eosina
K ⁺	-	Íon potássio
IL-1	-	Interleucina 1
IL-3	-	Interleucina 3
IL-4	-	Interleucina 4
IL-6	-	Interleucina 6
INF- γ	-	Interferon gama
Kg	-	Kilograma
LTs	-	Leucotrienos
M-CSF	-	Fator estimulador de colônia de macrófagos
ME	-	Microscópio eletrônico
MET	-	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
ML	-	Microscopia de luz
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mm ³	-	Milímetro cúbico
nm	-	Nanômetro
OAF	-	Fator ativador de osteoclastos
OsO ₄	-	Tetróxido de ósmio
PGs	-	Prostaglandinas
PGE	-	Prostaglandina E
PGE ₁	-	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
PTH	-	Hormônio da paratireóide
RGD	-	Arginina-glicina-ácido aspártico
SNC	-	Sistema nervoso central
TGF- β	-	Fator transformante de crescimento beta
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores, média e desvio padrão do peso em gramas (g) durante o período do experimento para cada animal.....	103
Tabela 2	Teste de <i>Mann-Whitney</i> para comparação das médias de peso os grupos placebo e experimental , para cada dia do experimento.....	104
Tabela 3	Teste de <i>Wilcoxon</i> para comparação das médias de peso em gramas (g) e diferença do peso aferido (M) a cada dia, para os grupos placebo e experimental	105
Tabela 4	Valores, média e desvio padrão da separação dentária em milímetros (mm) a cada período de medição para os grupos placebo e experimental	107
Tabela 5	Teste de <i>Wilcoxon</i> para comparação das médias de separação dentária em milímetros (mm) e diferença da média (M) para os grupos placebo e experimental	108
Tabela 6	Teste de <i>Mann-Whitney</i> para comparação das médias de separação dentária em milímetros (mm) e diferença da média (M) entre os grupos placebo e experimental nos dias de aferição.....	108
Tabela 7	Coeficiente linear de Spearman (r) entre peso e movimento dentário nos grupos placebo e experimental	108

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
2.1 PERIODONTO.....	4
2.2 FATORES REGULADORES DO REMODELAMENTO ÓSSEO.....	49
2.3 ABSORÇÃO RADICULAR ASSOCIADA AO TRATAMENTO ORTODÔNTICO	64
2.4 OS BENZODIAZEPÍNICOS E O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO	70
3 PROPOSIÇÃO.....	79
4 MATERIAL E MÉTODO.....	80
4.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	81
4.2 AMOSTRA.....	83
4.3 DOSAGEM E APLICAÇÃO DA MEDICAÇÃO.....	84
4.4 ANESTESIA E SEDAÇÃO.....	85
4.5 CONFEÇÃO DO DISPOSITIVO ORTODÔNTICO.....	86
4.6 PREPARO DOS DENTES E COLAGEM DO DISPOSITIVO.....	87
4.7 CONTROLE CLÍNICO DA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA.....	91
4.8 SACRIFÍCIO E PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS.....	91
4.9 PREPARO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	92

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	100
5 RESULTADO.....	102
5.1 ACHADOS RADIOGRÁFICOS.....	102
5.2 ACHADOS CLÍNICOS.....	102
5.3 ACHADOS HISTOLÓGICOS.....	110
6 DISCUSSÃO.....	149
7 CONCLUSÃO.....	170
8 RECOMENDAÇÕES.....	172
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	174

1 INTRODUÇÃO

A essência do tratamento ortodôntico é a resposta tecidual do periodonto de sustentação à aplicação de força, resultando no movimento dentário.

Desde a clássica descrição das mudanças histológicas associadas à força ortodôntica feita por Sandstedt (MACAPANPAN, WEINMANN e BRODIE, 1954; DEANGELIS, 1970), onde o osso alveolar é absorvido no lado de pressão pelos osteoclastos, enquanto os osteoblastos depositam novo osso nas zonas de tração, os eventos que levam a esse fenômeno têm sido extensivamente estudados. Houve o surgimento de vários modelos hipotéticos para o mecanismo do movimento dentário, inclusive com recentes e promissores avanços na área da biologia molecular, favorecendo o conhecimento das prováveis interações físicas e bioquímicas geradas pela força mecânica aplicada sobre o periodonto (LILJA, LINDSKOG e HAMMARSTRÖM, 1983; SANDY, FARNDAL e MEIKLE, 1993, NOREVAL, FORSGREN e MATSSON, 1995; MUNDY, 1999).

Embora longe de completa resolução, sabe-se atualmente que o remodelamento ósseo é controlado por ampla variedade de fatores sistêmicos e humorais, além da força mecânica. Vários trabalhos, por exemplo, têm demonstrado que o nucleotídeo cíclico adenosina 3' 5' monofosfato (AMPc) é importante mediador na transdução do estímulo mecânico em resposta biológica pelas células ósseas (YAMASAKI, 1983; SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986; DAVIDOVITCH, NICOLAY, NGAN *et al.*, 1988).

Condições sistêmicas e agentes farmacológicos usados na Medicina podem interferir no mecanismo de ação dessas substâncias reguladoras do metabolismo ósseo, seja inibindo ou potencializando, afetando conseqüentemente, o remodelamento dos tecidos de sustentação dos dentes durante o movimento dentário ortodôntico.

O diazepam é classificado como umas das drogas sedativas mais comumente prescritas para pacientes de todas as idades, com grande variedade de indicações clínicas como para o tratamento da ansiedade, como relaxante muscular, medicamento anticonvulsivante e em condições pré-operatórias (DIVOLL, GREENBLATT, OCHS *et al.*, 1983; WAN, XIA e HE *et al.*, 1996). A literatura relata que esse medicamento aumenta a concentração de AMPc em várias células, por sua ação inibitória sobre a enzima fosfodiesterase, responsável pelo controle da concentração intracelular desse nucleotídeo, ao promover sua hidrólise para AMP (BARDIN, DORWARD, LAMPE *et al.*, 1998).

É importante frisar que os experimentos *in vivo* realizados em modelos animais são fundamentais para a Odontologia. As informações clínicas e histológicas utilizadas de modo criterioso constituem importante instrumento quando comparadas aos resultados em humanos, no diagnóstico e na análise dos resultados clínicos. Este estudo foi, portanto, realizado com o objetivo de avaliar as alterações clínicas e teciduais decorrentes da administração do diazepam em cobaias durante o movimento dentário ortodôntico.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 PERIODONTO

O periodonto é estrutura de vital importância para o ortodontista, influenciando diretamente sua atividade profissional. Ele abrange a gengiva, o cemento radicular, o osso alveolar e o ligamento periodontal, tecidos que se desenvolvem e funcionam como uma unidade (FURSTMAN e BERNICK, 1972), sendo que essas três últimas estruturas compõem especificamente o periodonto de sustentação ou suporte dos dentes (BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994).

Durante o tratamento ortodôntico, todo o processo de remodelamento ósseo e fibroso passa a ser coordenado e manipulado pela introdução de um agente clínico que interfere com o controle intrínseco da movimentação dentária. O estudo da morfologia, da fisiologia das estruturas de suporte dos dentes e das reações celulares e bioquímicas que ocorrem nesse sistema passa a ser fundamental para a realização de um tratamento ortodôntico

racional, aumentando as chances de sucesso, com o mínimo de recidiva (ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; ENLOW, 1993; ROBERTS, 1996).

2.1.1 LIGAMENTO PERIODONTAL

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo extremamente singular, com importante função de ancoragem dos dentes e manutenção da integridade dos tecidos mineralizados adjacentes, ou seja, o osso alveolar e o cemento dentário (MATSUDA, KUMAR, RAMAKRISHNAN *et al.*, 1993; BASDRA e KOMPOSCH, 1997; LINDHE, KARRING e LANG, 1999).

Sob ação de forças ortodônticas, o ligamento periodontal oferece oportunidade única para o estudo da cinética celular relacionada com o remodelamento ósseo, visto que os mecanismos osteogênicos nele definidos são aplicáveis a outras estruturas ósseas do organismo, e sua grande vantagem reside no fato de poder ser analisado através de manipulação experimental razoavelmente simples (ROBERTS, MOZSARY e KLINGLER, 1982; ROBERTS e FERGUSON, 1989). O rápido remodelamento da matriz extracelular é base para sua utilização como modelo no estudo da homeostase e do remodelamento do tecido conjuntivo (McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000).

A presença de rico suprimento vascular e a alta celularidade marca a diferença entre o ligamento periodontal e os demais ligamentos e tendões, e embora fisicamente pequeno (sua largura em humanos varia, em média, de 0,1mm a 0,4mm), ele é essencial não só para o suporte dos dentes, como para a regulação do metabolismo ósseo e para o próprio desenvolvimento dentário

(GIANELLY e GOLDMAN, 1971; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990; TEN CATE, 1994; BASDRA e KOMPOSCH, 1997; McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000).

Por receber as forças da mastigação e da oclusão, o ligamento periodontal possui mecanoreceptores envolvidos com a abertura da boca, com os reflexos de fechamento e com o movimento dos dentes, além das terminações nervosas nociceptivas (MAEDA, SATO, KOBAYASHI *et al.*, 1989), onde as unidades sensoriais transmitem os sinais mecânicos e dolorosos ao núcleo mesencefálico e ao gânglio trigeminal (BERKOVITZ e SHORE, 1978; FUKUDA e TAZAKI, 1994). As fibras nervosas do ligamento apresentam variações tanto no arranjo das fibras como na sua morfologia, podendo ser encontradas fibras mielinizadas associadas a células de Schwann, fibras mistas (mielinizadas e não-mielinizadas), e fibras não-mielinizadas em estreita relação com os vasos sangüíneos (BEVELANDER e NAKAHARA, 1968). Embora BERNICK (1959) não tenha observado a presença de estruturas encapsuladas terminais especializadas, MAEDA e colaboradores (1989) relataram a existência, em ratos, de terminações do tipo Ruffini, que são receptores associados com a tração do ligamento. FUKUDA e TAZAKI (1994), por sua vez, também encontraram corpúsculos encapsulados no ligamento periodontal humano.

Como em todo tecido conjuntivo, o ligamento possui, além das fibras, a substância fundamental amorfa, assim chamada pela ausência de estruturas histológicas (BEVELANDER e NAKAHARA, 1968; SOMERMAN, YOUNG, MOEHRING *et al.*, 1990), sendo constituída basicamente de proteoglicanas (fibronectina e laminina) e glicosaminoglicanas (polissacarídeos), além de

grande concentração de água, fornecendo substrato adequado para o crescimento e diferenciação das células (ROSS e ROMRELL, 1993; REITAN e RYGH, 1996). Essa composição química pode estar relacionada à capacidade dos dentes de resistir às cargas mecânicas, visto que as proteoglicanas são importantes na determinação das propriedades viscoelásticas das articulações e de outras estruturas sujeitas à deformação mecânica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991; STRYER, 1992).

O estudo das interações entre as células e a matriz extracelular é recente e tem evoluído graças ao isolamento químico dos componentes da própria matriz, através de métodos imunohistoquímicos e por caracterização dos receptores celulares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997). As fibronectinas, por exemplo, são glicoproteínas adesivas extracelulares que contém em sua molécula sítios que as prendem tanto aos receptores de superfície das células, genericamente chamados de integrinas, como aos componentes da matriz, ficando desse modo, estabelecida a comunicação da matriz extracelular com as células, o que possivelmente explicaria o papel exercido pela matriz no citoesqueleto celular (HYNES, 1987; BERTOLAMI e BRONSON, 1989).

As fibras colágenas densas são predominantes, mas além desse grupo, fibras elásticas reticulares e oxitalânicas também são encontradas em pequenas quantidades (REITAN e RYGH, 1996). As fibrilas colágenas do ligamento periodontal são vistas reunidas, formando fibras quando examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão, mas sob microscopia de luz (ML) elas estão agrupadas nos feixes das fibras principais. De acordo com seu arranjo, as fibras colágenas são classificadas como crista-alveolares,

horizontais, apicais, e oblíquas. Alguns autores ainda incluem o grupo das interradiculares (CIANCO, NEIDERS e HAZEN, 1967; TEN CATE, 1994; LINDHE, KARRING e LANG, 1999; McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000).

As fibras de Sharpey são fibras embebidas no osso alveolar e cimento. Elas estão associadas a outras fibras não-colagenosas, como a osteopontina e a sialoproteína, também identificadas no cimento radicular, contribuindo com a regulação da mineralização e coesão tecidual nos sítios de estresse biomecânico (McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000). Por outro lado, as fibras elásticas parecem estar restritas às paredes dos vasos sanguíneos. Essas fibras são tipicamente mais delgadas que as colágenas, sendo difícil fazer a distinção entre elas nos preparados corados rotineiramente com hematoxilina e eosina (HE). A função das fibras oxitalânicas ainda é desconhecida, porém tem sido sugerido que possam ser fibras elásticas imaturas que atuam colaborando na sustentação dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, estando localizadas mais próximo ao dente do que ao osso alveolar, freqüentemente inseridas no cimento (BHASKAR, 1989; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990; REITAN e RYGH, 1996; LINDHE, KARRING e LANG, 1999).

As fibras principais atravessam o espaço do ligamento periodontal em disposição ondulada, permitindo ao dente mobilidade fisiológica, a despeito da natureza inelástica das fibras colágenas (BEVELANDER e NAKAHARA, 1968; LINDHE, KARRING e LANG, 1999). De acordo com SICHER e DUBRUL (1977), as fibras dos feixes não se estendem ininterruptamente através de toda a largura do espaço periodontal, do osso ao cimento, havendo na região central do ligamento um plexo, ao qual denominou de intermediário, zona não muito larga de fibras argirófilas dispostas irregularmente, onde deve ocorrer a

união e o entrelaçamento das fibras inseridas no osso e cimento. Desse modo, as fibras terminariam ou iniciariam em algum lugar da zona média do ligamento periodontal e a dissolução das conexões entre elas aconteceria nesta zona, com produção de novas fibras e formação de novas conexões, adaptadas funcionalmente, permitindo o rápido remodelamento das fibras e os ajustes necessários no ligamento para conciliar com os movimentos dos dentes.

KRAW e ENLOW (1967), em estudo histoquímico, aplicaram o conceito do plexo intermediário com algumas modificações. Para esses autores, como o colágeno nessa região é menos maduro, sugeriu-se que essa zona funcionasse para ajustar o comprimento das fibras principais, através da união das fibras mais maduras provenientes dos tecidos mineralizados do osso e cimento, com aquelas recém formadas nessa região.

Entretanto, a existência do plexo intermediário foi questionada e criticada por vários pesquisadores, que a partir das evidências oriundas da microscopia eletrônica, auto-radiografia e experimentos cirúrgicos com dentes de erupção limitada não acharam suporte para esse conceito, sendo este, na verdade, um artefato originado do plano de secção tecidual (ZWARYCH, 1965; CIANCO, NEIDERS e HAZEN, 1967; BEVELANDER e NAKAHARA, 1968; DIAZ, 1978). Provavelmente algum mecanismo deve existir para o ajuste do ligamento, visto que o colágeno é continuamente remodelado, de tal forma que fibrilas antigas são removidas e novo colágeno é acrescentado ininterruptamente.

Uma abordagem mais atual para o conceito do plexo intermediário foi proposta por ENLOW (1993). De acordo com esse autor, assim como o perióstio e as suturas, o ligamento periodontal possui três camadas básicas, uma associada ao osso, outra ao cimento, ambas caracterizadas por densos e

organizados feixes de fibras emergentes, e uma camada média, razão da controvérsia, então chamada de plexo intermediário, composta por fibrilas pré-colagenosas de união, que proporcionariam conexões e reconexões seqüenciais, entre as camadas fibrosas densas mais internas e as mais externas, com a função de ajustar os movimentos envolvidos com o remodelamento alveolar.

Para GIANELLY e GOLDMAN (1971) o intercâmbio e a produção de colágeno com maior intensidade não precisa estar localizado especificamente no centro do ligamento periodontal. KOUMAS e MATHEWS (1969) demonstraram que a porção alveolar do ligamento periodontal apresenta marcante atividade de síntese de fibras colágenas, tanto no lado de pressão como de tração. McCULLOCH e MELCHER (1983) observaram que a densidade e a proliferação celular ocorriam com maior intensidade nas áreas adjacentes ao osso, aos vasos sangüíneos do que na área central do ligamento periodontal, porém com menor intensidade na zona próxima à superfície radicular.

Outro fato que destaca a importância funcional do ligamento periodontal é sua capacidade de agir como amortecedor hidráulico às forças da oclusão. Essa propriedade, denominada de viscoelasticidade, permite que as fibras do ligamento não se comportem simplesmente como tiras que transmitem tensão à parede do alvéolo, mas na verdade, todos os componentes do ligamento, do protoplasma celular à rede vascular e à substância fundamental, atuam absorvendo o choque mecânico (BIEN, 1966; TEN CATE, 1994).

Esses componentes, agindo como sistema metabólico associado ao apropriado desenho arquitetônico tecidual, facilitam às funções do ligamento, o

que é imprescindível para qualquer sistema biológico que receba diariamente cargas biomecânicas repetidas (CHO e GARANT, 2000). Como os fluidos tissulares sob pressão são incompressíveis, foi sugerido que quando força mecânica é aplicada aos dentes, os fluidos escoariam pelos forames do osso alveolar, com a força sendo, então, transmitida ao osso alveolar que se curvaria em resposta (ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; PROFFIT, 1995; REITAN e RYGH, 1996).

Durante o movimento dentário, os feixes de fibras colágenas são alongados e comprimidos (REITAN e RYGH, 1996), e seja sob condições fisiológicas ou terapêuticas, no caso da movimentação ortodôntica, o ligamento tem a inerente habilidade de manter sua largura, tanto pelo seu próprio remodelamento, como do osso alveolar. Esse fenômeno permite ao dente se mover para uma nova posição no processo alveolar dos ossos maxilares, mantendo a arquitetura e a função do próprio ligamento nesta nova posição (ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981).

2.1.1.1 Os fibroblastos e a síntese de colágeno

Os fibroblastos são as células predominantes do ligamento periodontal, responsáveis pelo metabolismo dos componentes da matriz extracelular, atuando na formação das fibras extracelulares do tecido conjuntivo, na produção de substância fundamental amorfa na qual as fibras estão embebidas e entrelaçadas, e no desenvolvimento, estrutura e suporte dos dentes (CHO e GARANT, 2000). Além dessas funções, o fibroblasto exibe a habilidade de

contratibilidade e motilidade, importante para a organização estrutural dos tecidos conjuntivos (ROSS, 1968; BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994).

Apesar dos fibroblastos se assemelharem microscopicamente, os tecidos podem conter populações fenotipicamente diferentes de células, que variam em função da síntese de produtos, velocidade de síntese, resposta molecular regulatória e do próprio metabolismo da célula em geral (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979; McCULLOCH e BORDIN, 1991). Os fibroblastos podem ser considerados células multipotentes, com capacidade de se diferenciarem tanto em osteoblastos como em cementoblastos dependendo da necessidade ou das condições ambientais (MATSUDA, KUMAR, RAMAKRISHNAN *et al.*, 1993; LIN e GRINNEL, 1993; MATSUDA, YOKOYAMA, TAKESHITA *et al.*, 1998).

Nas preparações de rotina em parafina e coradas com HE, esta célula é reconhecida pela sua associação com as fibras colágenas. Numa amostra de tecido conjuntivo adulto, a estrutura da célula é característica, apresentando núcleo alongado, densamente corado e pouco citoplasma levemente eosinófilo, sendo difícil fazer sua distinção das fibras intercelulares, que também se coram com eosina. Em tais situações, o núcleo da célula costuma ficar mais evidente. Além disso, o fibroblasto possui longos e delgados prolongamentos citoplasmáticos que não podem ser distinguidos das fibras intercelulares nos preparados com coloração em HE (ROSS e ROMRELL, 1993; TEN CATE, 1994).

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), a célula ativa apresenta núcleo de face aberta, pouco impregnado, com citoplasma abundante, sendo as organelas mais notáveis o retículo endoplasmático

rugoso, as mitocôndrias, o complexo de Golgi e as vesículas de secreção, o que indica atividade sintética e secretora. Através de colorações especiais (anticorpos específicos para proteínas) pode-se evidenciar o sistema tubular e filamentoso, responsável pela habilidade contrátil da célula, pela manutenção da sua forma e pelo posicionamento das suas estruturas celulares (citoesqueleto). Raramente os fibroblastos são vistos, *in vivo*, em contato um com o outro, e sim isolados e aderidos ao substrato colagenoso da matriz, mas eventualmente quando entram em contato, suas membranas citoplasmáticas podem desenvolver complexos juncionais (ROSS, 1968; ROSS e ROMRELL, 1993).

A maioria dos fibroblastos do ligamento periodontal apresenta configuração intracelular polarizada, principalmente nas áreas de intensa formação de fibras. O núcleo fica num extremo da célula, o complexo de Golgi ao centro e o retículo endoplasmático na extremidade oposta da célula, próximo à superfície alveolar (GARANT e CHO, 1979 a, b).

Foi proposto que a fonte real da força mecânica propulsiva que possibilita os movimentos dos dentes deve-se aos miofibroblastos presentes nas faces de absorção do alvéolo. Essas células apresentam propriedades dos fibroblastos e das células musculares lisas. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi presentes são característicos dos fibroblastos, já os feixes relativamente grandes de miofilamentos, são típicos das células musculares lisas. A contração dessas células especiais poderia exercer efeito de tração sobre as fibras colágenas do interior do ligamento periodontal, e conseqüentemente sobre o dente, promovendo sua

movimentação na direção da área de absorção (ENLOW, 1993; ROSS e ROMRELL, 1993; TEN CATE, 1994).

Ainda não está totalmente esclarecida a relação entre a motilidade dos fibroblastos, sua capacidade de interagir com o meio ao seu redor, a síntese de fibras colágenas e o movimento dentário ortodôntico. Sabe-se que os fibroblastos respondem aos sinais externos através dos receptores presentes na sua membrana citoplasmática, com aumento ou diminuição da divisão celular, migração e secreção de matriz, e em virtude dessas respostas ocorre o remodelamento dos tecidos conjuntivos. O conhecimento dos sinais que os fibroblastos recebem e como respondem pode fornecer informações fundamentais para a biologia do movimento dentário (BERTOLAMI e BRONSON, 1989; GARANT e CHO, 1989).

Os fibroblastos mantêm-se aderidos ao substrato da matriz extracelular através de receptores de superfície para o colágeno e para fibronectina, assim como as demais células do ligamento. Esta adesão é essencial para a migração celular e para organização da matriz extracelular (CHO e GARANT, 2000). O arranjo linear dos sítios de fibronectina, cada um capaz de se ligar especificamente aos receptores de superfície das células, estabelece o mecanismo pelo qual a matriz poderia exercer efeito tanto na forma como no comportamento da célula e vice-versa (YAMAGUCHI, SHIMIZU, GOSEKI *et al*, 1994; CHO e GARANT, 2000).

Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de colágeno, a maior proteína estrutural extracelular dos organismos multicelulares, e provavelmente a mais importante pelas suas qualidades de estabilidade e força tênsil (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979). Sob ML, o colágeno revela-

se como fibras de espessura e orientação variadas entre as células do tecido conjuntivo, e com comprimento indeterminado no espaço extracelular. Já ao nível da MET é possível detalhar sua estrutura, sendo a fibrila a menor estrutura reconhecível, apresentando padrão característico de estrias periódicas que se repetem a cada 64 nm ao longo do comprimento da fibrila (3000Å), cujo diâmetro varia de 150 a 300 nm. Quando as fibrilas agregadas ultrapassam a espessura de 0,2 μm é que se tornam visíveis ao microscópio de luz, sendo chamadas de fibras colágenas (ROSS, 1968; ROSS e ROMRELL, 1993).

Cada molécula de colágeno consiste numa hélice composta de três cadeias polipeptídicas, entrelaçadas em configuração helicoidal ou espiral, chamadas cadeias α . Cada cadeia α contém pelo menos 1.000 aminoácidos, e embora cerca de 20 aminoácidos sejam encontrados no colágeno, quatro (glicina, alanina, prolina, hidroxiprolina) compõem dois-terços da molécula. Com exceção das curtas seqüências terminais, cada terceiro aminoácido em cada cadeia é a glicina. Desse modo, a fórmula molecular de uma cadeia α é aproximadamente a seguinte seqüência X-Y-Gli, onde x e y representam qualquer outro tipo de aminoácido, mas principalmente a prolina e a hidroxiprolina (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979; STRYER, 1992). O colágeno também contém pequenas quantidades de glicose e galactose (menos de 1% do peso), por isso é uma glicoproteína. É importante salientar que o colágeno sempre contém hidroxiprolina, e é a única proteína que contém hidroxilisina (TEN CATE, 1994).

A seqüência de aminoácidos e a sua composição peculiar parecem ter papel estratégico na estrutura da molécula de colágeno. A presença da glicina, o menor aminoácido na terceira posição parece ser crucial, pois permite a rotação das três hélices entre si (PIEZ, 1968; GIANELLY e GOLDMAN, 1971). A presença da prolina e da hidroxiprolina contribui para a estabilidade da molécula, e os demais aminoácidos que ocupam as posições X e Y, incluindo a própria prolina e a hidroxiprolina, determinam como as moléculas de colágeno irão se associar (PIEZ, 1968; PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979).

A análise química detalhada tem demonstrado existir no homem grande variedade de tipos de colágeno, que diferem quanto à posição ou seqüência dos aminoácidos nas posições X e Y, de modo que as cadeias α podem ser do tipo 1, 2, 3. Essa diversidade nos tipos de colágeno é explicada pelos múltiplos papéis estruturais que essa proteína desempenha (PIEZ, 1968; PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979). As três cadeias também podem associar-se entre si formando graus crescentes de polimerização e, embora já tenham sido identificados e classificados 19 tipos de colágeno de acordo com sua estrutura molecular, os 4 mais conhecidos são o tipo I, II, III e IV (TANZER, 1989; BUMANN, CARVALHO, SCHWARZER *et al.*, 1997).

Nos tipos I, II e III as moléculas de colágeno se associam paralelamente, formando fibrilas visíveis só ao MET, com diâmetro oscilando entre 20 a 300nm. No colágeno tipo II, a polimerização estaciona na fase de fibrila, como se observa nas cartilagens. Nos colágenos I e III, o processo de polimerização se acentua, sendo que no colágeno tipo III estas fibrilas se agrupam formando delgadas fibras chamadas de fibras reticulares do conjuntivo. No colágeno tipo

I, o processo prossegue com fibras mais espessas e freqüentemente associadas, formando feixes com até 20 µm de diâmetro, constituindo o que normalmente se chama de fibras de colágeno do tecido conjuntivo. No colágeno tipo IV, as moléculas se associam pelas extremidades, formando uma rede com aspecto de tela de arame (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991; STRYER, 1992; TEN CATE, 1994).

Embora o mecanismo celular para o metabolismo do colágeno já tenha sido descrito na literatura científica, a distribuição quantitativa dos distintos tipos presentes no ligamento periodontal ainda não foi detalhada. Colágeno do tipo III, V, VI, XII e XIV já foram encontrados no ligamento periodontal (BUMANN, CARVALHO, SCHWARZER *et al.*, 1997), mas a predominância é para o colágeno tipo I (BHASKAR, 1989). Este tipo de colágeno consiste de sólidas fibras ancoradas entre o osso alveolar e o cimento, fornecendo força tênsil suficiente e capacidade de resistir às forças mastigatórias. O colágeno tipo III forma fibrilas mais delicadas, contribuindo para certa elasticidade do ligamento. O colágeno tipo V é encontrado recobrando as fibras dos tipos I e III, talvez favorecendo a adesão celular, assim como a migração das células (GROTENDORST, SEPPÄ, KLEINMANN *et al.*, 1981; MARTINEZ-HERNANDEZ, GAY, MILLER, 1982). As curtas microfibrilas do colágeno tipo VI realizam a união das fibras do tipo I e III, e por fim, o colágeno tipo XII tem como função, a conexão das fibras colágenas com outros componentes da matriz extracelular (BUMANN, CARVALHO, SCHWARZER *et al.*, 1997).

A produção de fibras colágenas implica numa série de eventos, ocorrendo no citoplasma do fibroblasto, especificamente no interior das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi, e também

no exterior da célula. A sequência pode ser descrita, sumariamente, do seguinte modo: são produzidas cadeias polipeptídicas pelos polirribossomos do retículo endoplasmático rugoso, a partir da informação fornecida pelo RNAm (transdução); em seguida, ocorre a hidroxilação dos aminoácidos prolina e lisina, enquanto que os polipeptídios permanecem como cadeias individuais, ainda sem conformação helicoidal. O ácido ascórbico é importante fator para que essa hidroxilação ocorra, atuando como agente redutor (PETERKOFISKY, 1972; BRONCKERS, 1983).

Segue a formação da tríplice hélice pelas três cadeias polipeptídicas, exceto nos terminais (região telopeptídica), onde as cadeias continuam não enroladas. As moléculas de procolágeno formadas passam, via cisternas do retículo endoplasmático rugoso, para a região do Golgi, para adição de grupos de açúcares (glicosilação) no grupamento hidroxila da hidroxilisina. Ocorre também a formação de ligações dissulfeto entre as cadeias e no seu interior que influenciam a forma da molécula e estabilizam as interações polipeptídicas. Outras ligações ou pontes de hidrogênio entre as cadeias, ou forças eletrostáticas também contribuem para a estabilização da molécula, a qual após todo esse processo se move para o exterior da célula, em vesículas ou grânulos de secreção (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979; MURAD, GROVE, LINDBERG *et al.*, 1981).

Depois que o procolágeno é secretado para o espaço extracelular, a enzima procolágeno peptidase cliva a porção terminal da molécula, dando origem à molécula de tropocolágeno, que se agrega para formar a fibrila. Como as moléculas de colágeno se associam paralelamente e de modo escalonado, formam fibrilas que exibem ao MET, estrias transversais a cada 680Å,

alternando regiões claras e escuras num padrão de repetição periódica, ou de arranjo escalonado. Acredita-se que essa periodicidade de bandas claras e escuras esteja relacionada às diferentes densidades das fibrilas. A zona clara corresponde à sobreposição das fibrilas, por isso é mais densa, já a zona escura (400Å) representa a zona lacunar onde a calcificação parece ocorrer, através da deposição de cristais de fosfato e cálcio (GIANELLY e GOLDMAN, 1971; YAMAUCHI, KATZ e MECHANIC, 1986; TEN CATE, 1994). As fibrilas agregadas fazem ligações cruzadas covalentes entre os resíduos de lisina e hidroxilisina para garantir a estabilidade da molécula e fornecer força mecânica (TANZER, CHURCH, YAEGER *et al.*, 1974; PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN *et al.*, 1979). Trabalhos com auto-radiografias e estudos bioquímicos mostraram que em 10 minutos, moléculas de colágeno recém-sintetizadas já estão presentes nas vesículas do complexo de Golgi, e em 20 minutos estão prontas para secreção em grânulos associados aos microtúbulos. Após 30 minutos, as novas fibrilas se encontram no meio externo associadas aos fibroblastos (CHO e GARANT, 1981).

O remodelamento desta macromolécula indica a substituição das unidades velhas da proteína por novas, porém esse processo apresenta características próprias. A função primária de um tecido conjuntivo é fornecer estrutura que suporte e conecte os vários tecidos, o que sugere certa estabilidade. Entretanto, o remodelamento e a substituição de seus componentes ocorrem continuamente, mas a velocidade desse processo varia nos diferentes tecidos. Técnicas auto-radiográficas e imunohistoquímicas confirmam a rápida e eficiente maturação do colágeno no ligamento

periodontal, maior que na gengiva, pele e osso (CARNEIRO e MORAES, 1965; KOUMAS e MATHEWS, 1969; ORLOWSKI, 1978; SODEK, 1989).

O rápido remodelamento do colágeno nos tecidos periodontais pode ser evidenciado nos casos de deficiência de vitamina C, onde devido à carência de ácido ascórbico o metabolismo da macromolécula é severamente prejudicado (HUNT e PAYNTER, 1959; LITTON, 1974; MURAD, GROVE, LINDBERG *et al*, 1981). A meia-vida do colágeno no ligamento periodontal do incisivo do rato foi calculada em 9,5 dias por ORLOWSKI (1978) e em 8 dias por TAVERNE e colaboradores (1986). A meia-vida do colágeno no ligamento que apresenta erupção contínua de molares em cobaias também foi estimada em 8 dias. Por outro lado, os tecidos gengivais apresentam metabolismo lento do colágeno, em média de 18 dias (ORLOWSKI, 1978). Essa diferença pode ser devido ao fato das fibras gengivais não estarem inseridas no osso alveolar e, por isso, não contam com o processo de remodelamento ósseo, como ocorre com as fibras periodontais (EDWARDS, 1968).

Uma relação definida entre o metabolismo do colágeno e a função do ligamento periodontal não foi ainda estabelecida, restando dúvidas a respeito do mecanismo pelo qual o ligamento se remodela e mantém constante a posição e suporte dos dentes (DIAZ, 1978). Acredita-se que a integridade do ligamento depende das forças funcionais associadas ao movimento fisiológico dos dentes, com sua erupção contínua para manter a relação funcional durante o crescimento dos ossos maxilares e também com as forças derivadas da musculatura perioral. Essas mudanças de posição, mesmo que pequenas necessitam da reorganização das fibras do ligamento, e é por essa razão que

os dentes podem, com relativa facilidade, ser reposicionados durante a correção de uma maloclusão (SODEK, 1989).

Além dos fibroblastos, as células mesenquimais, os miofibroblastos, as células perineurais, os cementoblastos, os odontoblastos, os osteoblastos, as células cartilaginosas, entre outras também sintetizam colágeno (ROSS e ROMRELL, 1993).

A maneira pela qual o colágeno é degradado não está tão bem estabelecida quando comparada à sua síntese. Sabe-se que a degradação é realizada pelos fibroblastos, num mecanismo que permite o remodelamento do tecido sem prejudicar sua função. Os fibroblastos sintetizam grande variedade de metaloproteinases capazes de degradar fibras colágenas, proteoglicanas e outros componentes da matriz. Esta degradação provavelmente ocorre por hidrólise das cadeias peptídicas das macromoléculas de colágeno por essa classe de enzimas, reduzindo-as a pequenos fragmentos no ambiente extracelular (McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000).

Os fragmentos são fagocitados pelos próprios fibroblastos que exibem lisossomas para promover a digestão intracelular, principalmente por cisteína-proteinases. Com o advento da MET foi possível detectar a presença de fragmentos de colágeno no interior de vesículas contendo fosfatase ácida, comprovando a degradação do colágeno em duas etapas (DEPORTER e TEN CATE, 1973). Sendo assim, o remodelamento da fibra colágena pode ocorrer em sítios específicos, como, por exemplo, na remoção de fragmentos de fibras não ancoradas (PARAKKAL, 1964; TEN CATE e DEPORTER, 1975; TEN CATE, 1994).

2.1.1.2 Células progenitoras mesenquimais

Todo o tecido conjuntivo, incluindo o ligamento periodontal, contém células progenitoras de origem ectomesenquimal, com a capacidade de sofrer divisões mitóticas e diferenciação celular em fibroblastos, osteoblastos ou cementoblastos (GOULD, 1983; McCULLOCH e MELCHER, 1983; ROSS e ROMRELL, 1993). As células progenitoras são células pequenas, com escassas organelas intracelulares, e alta proporção na relação núcleo-citoplasma. A localização é predominantemente perivascular, externamente à lâmina basal e nos espaços endosteais adjacentes (GOULD, 1983; BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994).

Trabalhos com cinética celular usando marcadores demonstraram que populações de células indiferenciadas migram para longe dos vasos, sofrem mitoses e passam a ser fonte de novas células (GOULD, 1983). Entretanto, também existem células progenitoras perivasculares no ligamento periodontal, com algum grau de diferenciação, mas ainda com capacidade de síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e de atividade mitótica, o que mostra que essas células constituem população de difícil identificação, sendo bastante heterogênea e complexa (SCOTT, 1967; HALL, 1970; GOULD, 1983).

Existem dúvidas se as células progenitoras do ligamento periodontal constituem, por exemplo, uma única linhagem pluripotente, responsável pela origem de todas as células diferenciadas, ou se existem várias populações, cada uma dando origem a uma específica célula especializada (GOULD, MELCHER e BRUNETTE, 1977; McCULLOCH e MELCHER, 1983; BHASKAR, 1989).

Entretanto, quais fatores determinam a direção de diferenciação das células progenitoras, ou qual o mecanismo pelo qual as células se diferenciam especificamente em células formadoras de osso são questões ainda sem resposta (HALL, 1970; GOULD, 1983).

É importante citar que regulações parácrinas e autócrinas do metabolismo celular do ligamento periodontal são importantes na diferenciação induzida, inclusive pelo estresse mecânico aplicado nas células do ligamento. O próprio papel dos fatores de crescimento ectodérmicos tem sido avaliado como regulador da diferenciação osteoblástica e cementoblástica, inclusive a partir de células como os fibroblastos. (ROBERTS e FERGUNSON, 1989; MATSUDA, KUMAR, RAMAKRISHNAN *et al.*, 1993; MATSUDA, YOKOYAMA, TAKESHITA *et al.*, 1998).

2.1.1.3 Células ósseas e cementárias

As células do osso, osteoblastos e osteoclastos, e as células do cimento, cementoblastos e cementoclastos apesar de estarem propriamente associadas aos tecidos duros dos dentes, estão tecnicamente situadas no ligamento periodontal (GIANELLY e GOLDMAN, 1971; TEN CATE, 1994). A distribuição das células formadoras de osso ao longo da parede do alvéolo, os osteoblastos, e das células responsáveis pela sua absorção, os osteoclastos, depende do estado funcional do ligamento periodontal (TEN CATE, 1994).

2.1.1.4 Demais células

Embora os fibroblastos ocupem 30% em média do volume do ligamento periodontal, existe a presença de populações de células distintas aos próprios fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos (McCULLOCH, LEKIC e McKEE, 2000). Células epiteliais localizadas no ligamento, próximas ao cimento, são remanescentes da bainha epitelial de Hertwig. Essas células aparecem como uma rede, ou cordões, ou ainda como ilhas junto à superfície da raiz, aparentemente sem exercerem qualquer tipo de papel fisiológico, embora sob certas condições patológicas, como infecção periapical, as células dos restos epiteliais podem proliferar e dar origem a cistos e tumores (BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994). McCULLOCH e colaboradores (2000) relataram que recentes estudos observaram que as células epiteliais do ligamento podem sofrer transição epitélio-mesenquimal para fibroblastos e cementoblastos, os quais passam a depositar respectivamente, cimento acelular e celular.

Células inflamatórias como mastócitos, macrófagos e linfócitos também podem ser vistos no ligamento periodontal (YAMASAKI, SHIBASAKI e FUKUHARA, 1982; RYGH, 1989). Os mastócitos são células que contém heparina e histamina, mediadores químicos do processo inflamatório (YAMASAKI, SHIBASAKI e FUKUHARA, 1982; BHASKAR, 1989; ROSS e ROMRELL, 1993).

Os macrófagos do tecido conjuntivo também podem estar presentes no ligamento periodontal (KAWAHARA e TAKANO, 1995). Os precursores dos macrófagos sofrem vários ciclos de proliferação e diferenciação na medula óssea (8-10 dias), circulam como monócitos no sangue por 3 a 6 dias,

migrando então para os tecidos, e diferenciando-se em macrófagos (SUTTON e WEISS, 1966; GORDON, 1986). Se fixos, estão unidos às fibras colágenas, mas se estimulados, podem migrar para sítios específicos (GORDON, 1986; SHEWEMI, SHAMMARY, ZAMEL *et al.*, 1996).

A diferenciação entre macrófagos e fibroblastos é difícil através da ML, visto que ambas as células apresentam material fagocitado no citoplasma, embora a forma dos macrófagos varie de esférica a estrelar ou irregular, dependendo do estado funcional e de sua localização. Uma característica nem sempre evidente dos macrófagos é a aparência denteada do seu núcleo (ROSS e ROMRELL, 1993). Entretanto, a diferença mais marcante entre as duas células é a grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso presente no citoplasma dos fibroblastos, enquanto que nos macrófagos essas organelas são esparsas. Todavia, quando ativamente envolvida com fagocitose, a densidade do retículo endoplasmático rugoso aumenta, devido à elaboração de enzimas hidrolíticas (PARAKKAL, 1964; SCHEWEMI, SHAMMARY, ZAMEL *et al.*, 1996).

No citoplasma dos macrófagos são relativamente abundantes estruturas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, muitos vacúolos e lisossomas que contém várias enzimas proteolíticas, indicando a atividade específica de fagocitose. Os produtos de secreção liberados pelos macrófagos compreendem grande variedade de substâncias relacionadas com a resposta imunológica e inflamatória (ROSS, 1968; GORDON, 1986). Os macrófagos liberam potentes reguladores da atividade celular, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que provavelmente contribuem para a regulação homeostática do ligamento

periodontal (SCHEWEMI, SHAMMARY, ZAMEL *et al.*, 1996). Os fatores estimuladores de colônias (CSF), como o macrófago-CSF e o granulócito-macrófago-CSF produzidos pelos osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e pelos macrófagos têm como efeito principal estimulação dos progenitores hematopoiéticos, destinados a se diferenciarem nos próprios macrófagos (NAITO, 1993).

Monócitos e macrófagos são freqüentemente vistos associados às superfícies ósseas de absorção, em pacientes com doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide, doença periodontal e em tumores ósseos metastáticos, como também na superfície óssea endosteal. Apesar das evidências da origem a partir de um precursor comum, ainda não foi provado que os monócitos tenham capacidade de absorção óssea, embora, *in vitro*, esse fenômeno já tenha sido demonstrado (MUNDY, ALTMAN, GONDEK *et al.*, 1977; RIFKIN e HEIJL, 1979). No ligamento periodontal, os macrófagos removem o tecido necrótico e o colágeno das zonas hialinizadas (MUNDY, ALTMAN, GONDEK *et al.*, 1977; BRUDVIK e RYGH, 1993 a).

De acordo com SILVER e colaboradores (1988), os osteoclastos e os macrófagos embora compartilhem certas similaridades possuem diferentes papéis biológicos. Os macrófagos, ao contrário dos osteoclastos associados exclusivamente ao osso, são encontrados de preferência nos tecidos moles normais e em sítios de inflamação ou infecção tecidual. É importante citar que os histiócitos não derivam dos monócitos. São macrófagos do tecido conjuntivo propriamente dito, derivados das células mesenquimais indiferenciadas (SIQUEIRA e DANTAS, 1996).

2.1.2 CEMENTO

É o tecido dentário mineralizado que recobre as raízes dos dentes e, ocasionalmente pequenas porções das coroas. Assim como o osso alveolar, o cimento provê meio de ancoragem das fibras colágenas do ligamento periodontal, e embora possua muitas características em comum com o tecido ósseo, o cimento difere essencialmente deste por ser avascular, não possuir elementos neurais e não sofrer o processo de renovação tecidual fisiológica (BHASKAR, 1989; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990).

Logo após a desintegração da bainha reticular de Hertwig, os fibroblastos do folículo dental contactam a matriz da pré-dentina e passam a secretar fibras colágenas cementárias, adjacentes à raiz em crescimento, e componentes da substância fundamental (proteínas e complexos a base de proteínas e polissacarídeos), seguindo sentido unipolar e se afastando da matriz (GARANT e CHO, 1989). As fibras colágenas formadas ligam-se a essa matriz na proximidade da junção cimento-dentinária (CHO e GARANT, 2000). A matriz orgânica ou cementóide é depositada ritmicamente e conforme nova camada é formada, a anterior se mineraliza pelo crescimento de cristalitos de hidroxiapatita, sem a formação de vesículas da matriz, sendo que delgada camada de cementóide forrada por cementoblastos é sempre vista na superfície cementária (SELVIG, 1965; BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994).

Os cementoblastos mostram-se como células ovais ao longo da superfície cementária e como todas as células que produzem proteínas e polissacarídeos, possuem inúmeras mitocôndrias, desenvolvido aparelho de Golgi e grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, o que garante a

basofilia do citoplasma (SELVIG, 1964; BEVELANDER e NAKAHARA, 1968; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990). Os cementoblastos são descritos como células que apresentam características histológicas semelhantes às dos osteoblastos, talvez pela origem a partir da mesma célula progenitora (PAYNTER e PUDY, 1958).

Dos três tecidos dentários mineralizados, cemento é o menos duro e o menos mineralizado. O conteúdo mineral do cemento de um dente adulto contém por volta de 45% a 50% de substância inorgânica, principalmente cálcio e fosfato, sob forma de hidroxiapatita, e 50% a 55% de matéria orgânica e água. A matéria orgânica consiste primariamente de colágeno tipo I e polissacarídeos protéicos, além de substância fundamental amorfa (BHASKAR, 1989; SELVIG, 1964; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990). Os cristais de hidroxiapatita são depositados paralelos aos feixes de fibras colágenas da matriz orgânica, de modo semelhante ao osso e à dentina (SELVIG, 1965).

O cemento, normalmente, inicia-se como uma camada muito fina na região cervical da raiz e aumenta progressivamente em espessura em direção apical. Nos cortes histológicos pode-se distinguir dois tipos de cemento, o acelular, ou primário, e o celular, também chamado de secundário (CARRANZA, 1983; BHASKAR, 1989; FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990). O cemento acelular está unido à dentina, cobrindo a raiz desde a margem cervical até o ápice. Esse tipo de cemento é por vezes recoberto por cemento celular, associado com a época de erupção dos dentes, onde os cementoblastos ficam aprisionados em lacunas de sua própria matriz, passando a ser chamados de cementócitos, que aparentemente não

apresentam a mesma atividade dos osteócitos (PAYNTER e PUDY, 1958; ROBERTS e FERGUSON, 1989; TEN CATE, 1994).

O cimento acelular sob observação na MET apresenta constituição bastante regular, com espessos feixes de fibras colágenas penetrando para dentro da estrutura mais ou menos em ângulo reto (SELVIG, 1965). Não há distribuição restrita desses dois tipos de cimento sobre a raiz, mas o cimento celular predomina na metade apical da raiz, embora camadas alternadas desses dois tipos de cimento possam ocorrer (BHASKAR, 1983; CARRANZA, 1983). O cimento acelular é mais radiopaco do que o celular e ocupa de 40% a 70% da superfície radicular (SELVIG, 1965).

SELVIG (1964, 1965) demonstrou que as fibras colágenas, também chamadas de extrínsecas, vindas do ligamento periodontal e produzidas pelos fibroblastos, penetram profundamente nas camadas onde estava havendo deposição de cimento, sendo a superfície caracterizada por projeções calcificadas que correspondiam exatamente à inserção de cada feixe de fibra colágena. Segundo esse mesmo autor, existem também fibras colágenas, produzidas pelos cementoblastos, mas que não fazem parte do sistema de suporte dos dentes, estando dispostas ao longo da superfície radicular, circunscrevendo-a, participando do sistema intrínseco de fibras.

As fibras embebidas no cimento acelular estão total ou parcialmente calcificadas, e esse fato constitui explicação plausível para o baixo metabolismo do colágeno nessa região e, se algum metabolismo significativo existe nesse tecido, pode estar relacionado com o rearranjo molecular, mais do que com a formação de novas fibras (SELVIG, 1965).

Tanto o cimento acelular como o celular é demarcado por linhas incrementais, as linhas de Salter, de coloração basófila, que indicam os períodos alternados de formação e de ausência de atividade. Essas linhas são facilmente identificadas em espécimes descalcificadas, preparadas para observação ao nível de microscopia de luz, sendo difícil a observação em nível ultraestrutural (SELVIG, 1965; BHASKAR, 1983).

A deposição contínua de cimento tem grande importância funcional, pois como não é absorvido, há necessidade de aposição repetida de camadas para conservar intacto o sistema de ancoramento, e na medida em que o cimento aumenta em espessura, as fibras de Sharpey, que representam a porção terminal das fibras periodontais, são incorporadas às novas camadas depositadas (FURSETH, SELVIG e MJÖR, 1990; CHO e GARANT, 2000). Outro efeito da deposição contínua de cimento, especialmente em torno do ápice da raiz é a manutenção do comprimento total do dente, apesar da perda de esmalte provocada pelo desgaste oclusal (TEN CATE, 1994).

2.1.3 OSSO ALVEOLAR

O osso é uma forma especializada e complexa de tecido conjuntivo e, como os demais, composto por células e matriz extracelular. O que o distingue é seu complexo sistema biológico associado à constituição química e física diferenciada (GIANELLY e GOLDMAN, 1971; ROSS e ROMRELL, 1993).

O osso é formado em três fases, a matriz orgânica (33% a 35%), a fase mineral (65% a 67%) e a porção remanescente composta por água. A matriz é constituída na sua maior parte por fibras colágenas (colágeno tipo I) e

substância fundamental, formada principalmente por proteoglicanas e glicoproteínas, além de proteínas não-colagenosas. Existe também a presença de fibras reticulares. No interior da matriz óssea existem espaços chamados de lacunas que abrigam as células ósseas. O material inorgânico é constituído quase que exclusivamente por cálcio e ortofosfato inorgânico na forma de cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, que se depositam sobre e entre as moléculas de colágeno e no material orgânico não-colagenoso, mas existem também outros sais minerais. A água compõe a menor fração do osso, variando de 2% a 10%. Antes da mineralização da matriz, há cerca de 90% de água no tecido, mas durante a mineralização praticamente 80% da água é perdida (BHASKAR, 1989; GIANELLY e GOLDMAN, 1971; ROSS e ROMRELL, 1993; TEN CATE, 1994; SODEK e McKEE, 2000).

Entre as proteínas não-colagenosas, a osteocalcina e sialoproteína óssea são exclusivas dos tecidos mineralizados, já a osteonectina e a osteopontina apresentam distribuição mais generalizada, exercendo provavelmente importante papel no remodelamento ósseo (SODEK e McKEE, 2000). A osteocalcina, também chamada de proteína óssea Gla (ácido γ -carboxiglutâmico) vitamina K-dependente é a proteína de ligação com o cálcio e que acelera, em especial, a maturação e a quimiotaxia dos osteoclastos (TANAKA, HAJI, TAKAYANAGI *et al.*, 1996; BASDRA e KOMPOSCH, 1997; KOBAYASHI, TAKAGI, SAKAI *et al.*, 1998; MORISHITA, YAMAMURA, BACHCHU *et al.*, 1998, MUNDY, 1999). A osteocalcina pode ser detectada inclusive nas células ao longo da superfície radicular, incluindo a dentina, e embora as células do ligamento periodontal humano mostrem forte reação para osteocalcina, após estímulo com 1,25-diidroxicolecalciferol (1,25 DHCC),

dexametasona e estrógenos, os fibroblastos não respondem do mesmo modo (BERESFORD, JOYNER, DEVLIN *et al.*, 1994; BASDRA e KOMPOSCH, 1997; MORISHITA, YAMAMURA, BACHCHU *et al.*, 1998). O mecanismo de ação da osteocalcina parece ser mediado através do aumento dos níveis de cálcio no ambiente intracelular, mas faltam informações sobre seu preciso papel no processo de remodelamento ósseo (KOBAYASHI, TAKAGI, SAKAI *et al.*, 1998).

Tanto a osteopontina como a sialoproteína óssea são moléculas quimicamente similares que apresentam papel regulador da calcificação da matriz óssea e também têm sido associadas com adesão celular, inclusive dos osteoclastos (KOBAYASHI, TAKAGI, SAKAI *et al.*, 1998). A osteonectina é uma glicoproteína ligada predominantemente à fase mineral do osso, sendo que estudos *in vitro* sugerem seu papel na regulação da adesão e proliferação celular, como também na modulação da atividade das citocinas. Outras proteínas também encontradas no osso são, principalmente, os peptídeos pró-colagenos, a fibronectina e a enzima fosfatase alcalina, importante para que ocorra a mineralização (SODEK e McKEE, 2000).

O osso desempenha importantes funções de sustentação, proteção e locomoção, mas também é o reservatório primário de 99% do cálcio e 80% do fosfato do organismo, além de armazenar magnésio, sódio e carbonato, mobilizados e captados pelo sangue para manter níveis apropriados nos os tecidos do corpo, se necessário (TEN CATE, 1994; ROBERTS, 1996; MUNDY, 1999).

O processo alveolar, idêntico ao osso de qualquer outra região do organismo, pode ser definido como a parte da maxila ou da mandíbula que

forma e suporta os alvéolos, os quais abrigam os dentes. Como todo tecido ósseo, o processo alveolar está em constante renovação, e embora seja um dos tecidos mais duros do organismo humano, é ao mesmo tempo altamente plástico, permitindo a movimentação dos dentes sem que estes rompam sua relação com o osso alveolar (BHASKAR, 1989, TEN CATE, 1994).

O osso alveolar também pode ser chamado de placa crivosa, mas é especificamente chamado de osso fasciculado porque proporciona a inserção dos feixes de fibras do ligamento. As placas corticais apresentam camadas superficiais de osso lamelar, suportado por osso compacto, resistente, organizado e bem mineralizado, e osso esponjoso ou trabecular preenche o espaço entre as placas. A comunicação do ligamento periodontal com os espaços medulares do osso alveolar se dá através de inúmeros canais vasculares, os canais de Volkmann (GIANELLY e GOLDMAN, 1971; BHASKAR, 1989; ROSS e ROMRELL, 1993; TEN CATE, 1994; ROBERTS, 1996).

A estrutura histológica do osso fasciculado é descrita como consistindo de feixes de fibras grosseiras entrelaçadas, dispostas paralelamente à superfície do alvéolo, formando lamelas, sendo que mergulhadas neste osso estão os feixes de fibras do ligamento, as fibras de Sharpey. Como esse tipo de osso contém menos fibrilas do que o osso lamelar aparece mais escuro nos preparos com HE (BHASKAR, 1989; TEN CATE, 1994; ROBERTS, 1996.). A organização estrutural e o padrão de remodelamento do osso alveolar são complexos, devido à presença dos dentes e pela própria resposta desse tecido às forças mastigatórias, o que também exige contínua reestruturação das fibras de Sharpey (SODEK e McKEE, 2000).

As células associadas ao tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, sendo que os principais estudos de fisiologia e endocrinologia do metabolismo ósseo estão concentrados nas mudanças de atividade das células de formação e de absorção óssea, sujeitas a ação de hormônios calciotrópicos, drogas ou forças mecânicas que rompem o delicado equilíbrio entre elas, acarretando efeitos indiretos no metabolismo ósseo, e conseqüentemente, no crescimento e no remodelamento do osso (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; ROSS e ROMRELL, 1993).

2.1.3.1 Células da linhagem osteoblástica

No arcabouço craniqfacial, tanto os ossos de origem endocondral ou intramembranosa são formados a partir das células da crista neural. Os osteoblastos representam família heterogênea de células derivadas diretamente do ectomesenquima, do qual fazem parte as células da crista neural. Tem sido sugerido que as células formadoras de osso são oriundas da maturação das células precursoras indiferenciadas em pré-osteoblastos e, finalmente em osteoblastos (ROBERTS e FERGUSON, 1989; BURR e MARTIN, 1989; BASDRA e KOMPOSCH, 1997; MATSUDA, YOKOYAMA, TAKESHITA *et al.*, 1998).

As células ectomesenquimais indiferenciadas dão origem a uma série de células: reticulares, fibroblastos, adipócitos e células osteogênicas (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986). As células da linhagem osteogênica compreendem, os osteoblastos, condroblastos, provavelmente fibroblastos do periósteo e pericôndrio (GOULD, MELCHER e BRUNETTE, 1977; McCULLOCH e

MELCHER, 1983; GOULD, 1983). As células da linhagem osteoblástica incluem especificamente os osteoblastos maduros, os osteócitos e as células de revestimento das superfícies ósseas (MUNDY, 1999). As células osteoprogenitoras compõem a população celular presente na camada mais interna do periósteo, as células endósteas de revestimento dos canais medulares (ROSS e ROMRELL, 1993).

Entre os vários e possíveis fatores envolvidos no controle da diferenciação das células dessa linhagem, recentemente demonstrou-se que o fator de crescimento ectodérmico (EGF) e seu sistema receptor exercem efeito bloqueador ou regulador na diferenciação osteoblástica (MATSUDA, YOKOYAMA, TAKESHITA *et al.*, 1998). Existem também evidências de que as células mesenquimais indiferenciadas perivasculares e os fibroblastos presentes no ligamento periodontal possam, por exemplo, se diferenciar em células formadoras de tecido duro, como o osteoblasto e o cementoblasto, mas os fatores que influenciam esse processo ainda são desconhecidos (McCULLOCH e MELCHER, 1983).

Sumariamente, são quatro os distintos estágios de diferenciação dos osteoblastos: pré-osteoblastos, os precursores diretos dos osteoblastos; osteoblastos adultos ou maduros; células de revestimento encontradas nas superfícies dos ossos adultos; e os osteócitos, estágio final de diferenciação dos osteoblastos formados na medida que alguns osteoblastos são incorporados à matriz óssea ainda não-calcificada (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; SODEK e McKEE, 2000).

As células de revestimento compõem a população celular presente na camada mais interna do periósteo, as células endósteas de revestimento das cavidades medulares e as células de revestimento dos canais de Havers e de Volkmann. A transição de um osteoblasto para uma célula de revestimento envolve mudanças morfológicas e funcionais que culminam com o decréscimo de secreção protéica (MILLER, BOWMAN, SMITH *et al.*, 1980). Acredita-se que essas células funcionem na manutenção e no suporte nutricional dos osteócitos, podendo influenciar no metabolismo do fosfato e do cálcio e no remodelamento ósseo. As células de revestimento separam o fluido extracelular do fluido ósseo específico que circula através do sistema canalicular e que banha a superfície óssea, agindo como sistema tampão para as ligeiras flutuações da concentração de cálcio no fluido extracelular (PARFITT, 1987).

O osteócito, célula óssea madura que se encontra incluída na matriz óssea depositada previamente quando era osteoblasto, ocupa uma lacuna que se amolda à sua forma lenticular e que possui extensões por onde os prolongamentos citoplasmáticos fazem comunicação de uma célula com a outra, e com a superfície óssea, garantindo sua nutrição. Nos cortes corados com HE, os canálculos e prolongamentos não são discerníveis e muitas vezes a célula fica distorcida devido à retração e aos outros artefatos resultantes da descalcificação da matriz óssea, sendo o núcleo a única característica proeminente. Supunha-se que o osteócito seria capaz de modificar a matriz óssea circundante de acordo com as demandas metabólicas, contribuindo principalmente para a homeostase do cálcio sanguíneo (ROSS e ROMRELL, 1993). Entretanto, observações detalhadas com microscopia eletrônica de

varredura têm demonstrado que tal efeito não passa de artefato (MUNDY, 1999).

O osteoblasto é a célula responsável pela produção da matriz óssea não mineralizada ou osteóide, estando diretamente relacionado com a secreção das proteínas da matriz como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e a osteonectina. Os osteoblastos também mineralizam a recém-formada matriz óssea, com a participação de partículas subcelulares conhecidas como vesículas da matriz geradas no citoplasma da própria célula (MUNDY, 1999).

O potencial osteogênico dessas células pode ser identificado pelos altos níveis de fosfatase alcalina, cuja indução responde a fatores como o metabólito ativo da vitamina D (1,25 DHCC), o hormônio da paratireóide (PTH) e também as proteínas não-colagenosas da matriz. É importante citar que o termo fosfatase alcalina designa um grupo de enzimas capaz de remover fosfato do substrato orgânico, num pH alcalino, pela hidrólise dos ésteres de monofosfato, levando à supersaturação e precipitação dos sais de fosfato de cálcio no substrato colagenoso (YAMASHITA, SATO e NOGUCHI, 1987; MEGHJI, 1992; TEN CATE, 1994; BASDRA e KOMPOSCH, 1997).

Os osteoblastos também secretam fatores de crescimento armazenados na matriz, como fator transformante de crescimento- β (TGF- β), proteínas ósseas morfogenéticas, fator de crescimento derivado das plaquetas e fatores de crescimento semelhantes à insulina, entre outros. Os fatores de crescimento podem, por exemplo, causar tanto a inibição como a estimulação da proliferação e diferenciação das células ósseas (MEGHJI, 1992; YAMAGUCHI, SHIMIZU, GOSEKI, *et al.*, 1994; SODEK e McKEE, 2000).

O papel das forças mecânicas no mecanismo de diferenciação celular também deve ser analisado, pois fisiologicamente o ligamento periodontal é submetido de modo contínuo ao estresse mecânico provocado pelas forças oclusais, além disso, o remodelamento do ligamento e osso alveolar ocorre em resposta às forças ortodônticas (BASDRA e KOMPOSCH, 1997). De fato, já foi demonstrado que as células respondem ao estresse mecânico, com alterações significantes em sua estrutura e função, através da secreção de fatores solúveis capazes de regular a função das células por via autócrina e parácrina (YAMAGUCHI, SHIMIZU, GOSEKI *et al.*, 1994; YAMAGUCHI, SHIMIZU, SHIBATA *et al.*, 1996; MATSUDA, YOKOYAMA, TAKESHITA *et al.*, 1998).

Os osteoblastos maduros, na ML, apresentam-se como estruturas cúbicas ou poligonais, de abundante citoplasma basófilo, agregadas à superfície óssea em formação, embora pareça haver uma faixa clara entre a célula e o osso. Na verdade, trata-se da matriz recém formada, chamada de osteóide, que se cora fracamente, em contraste com a matriz mineralizada que se cora intensamente com eosina. Ao nível da MET, o osteoblasto é caracterizado pela grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso presente e de ribossomas. livres, daí a alta basofilia observada na ML. O complexo de Golgi também é abundante, contendo numerosas vesículas, possivelmente os precursores da matriz. São vistos também delgados prolongamentos citoplasmáticos que penetram no osteóide recém-produzido, unindo-se através de junções comunicantes com as células vizinhas (BHASKAR, 1989; ROSS e ROMRELL, 1993; TEN CATE, 1994).

Quanto aos eventos celulares envolvidos na formação óssea, estes incluem a quimiotaxia de osteoblastos precursores ao local previamente

absorvido pelos osteoclastos, a estimulação de sua proliferação, seguida de sua diferenciação em osteoblastos maduros, capazes de sintetizar proteínas ósseas, e outros fatores estruturais componentes da matriz óssea, além de promoverem a mineralização dessa matriz orgânica recém formada (MUNDY, 1991). A formação da fibrila colágena no osso é iniciada quando os filamentos de colágeno secretados pelos osteoblastos se agrupam em fibrilas estriadas, formando o osteóide, com núcleos de calcificação podendo ser observados no interior desse substrato (SODEK e McKEE, 2000).

De acordo com ROBERTS e JEE (1974), a seqüência cinética celular de nova formação óssea envolvida com a estimulação ortodôntica mostra um pico de novos pré-osteoblastos em 8 horas a partir de células indiferenciadas. Em 20 horas ocorre o máximo de síntese de DNA, o que representa a alteração genômica, e em 30 horas ocorre intensa atividade mitótica. A formação óssea inicia-se, então em cerca de 40 a 48 horas após a aplicação de força ortodôntica.

A função osteogênica dos osteoblastos é apenas uma das facetas de uma célula idealmente posicionada para funcionar como mediadora na regulação do metabolismo ósseo. Existem crescentes evidências mostrando que a ação dos hormônios com tropismo ósseo, das citocinas e das prostaglandinas, além da própria ativação osteoclástica, é mediada através dos osteoblastos, devido à presença de receptores específicos para vários agentes químicos em sua superfície celular (RODAN e MARTIN, 1981, MUNDY, 1991).

2.1.3.2 Os osteoclastos e o mecanismo molecular da absorção óssea

Os osteoclastos são células multinucleares gigantes responsáveis pela absorção óssea, que não se replicam por divisão celular, mas aumentam de tamanho pela fusão e incorporação de outras células da mesma linhagem, os osteoclastos precursores (BARON, NEFF, LOUVARD *et al.*, 1985; LORENZO, SOUZA, FONSECA *et al.*, 1987).

Na ML, os osteoclastos são vistos como células grandes (50-100 μm), facilmente identificáveis pela presença de vários núcleos e pela notável eosinofilia, podendo ser encontrados solitários ou em pequenos grupos de células nas superfícies ósseas endosteais, nos sistemas harvesianos e ocasionalmente nas superfícies periosteais. Com a utilização de técnicas histoquímicas, a célula apresenta forte reação para fosfatase ácida, devido à grande quantidade de lisossomas, razão da acidofilia do citoplasma (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; ROSS e ROMRELL, 1983; BARON, 1989). Ao nível ultraestrutural, os osteoclastos contêm várias mitocôndrias, desenvolvido complexo de Golgi, múltiplos lisossomas, retículo endoplasmático rugoso localizado na periferia dos núcleos e, como são células polarizadas, a região nuclear fica localizada na porção mais distante da superfície óssea (KALLIO, GARANT e MINKIN, 1972; HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; MUNDY, 1999).

A característica mais marcante dessa célula quando ativa é a presença da borda em escova ou borda pregueada, ou ainda franjada, porção especializada da membrana plasmática adjacente à área de absorção óssea. A borda em escova consiste, na verdade de várias dobras ou invaginações da

membrana plasmática, aumentando consideravelmente sua superfície de absorção (KROON, 1954; BARON, 1989; ROSS e ROMRELL, 1993).

Adjacente à borda em escova, ou melhor, delimitando essa área particular, está a zona clara. Essa zona, completamente desprovida de organelas celulares, mas rica em proteínas contráteis (estruturas citoesqueléticas), é responsável pela firme adesão dos osteoclastos ao sítio de absorção e, conseqüentemente pela criação do espaço extracelular segregado que engloba a borda em escova e o substrato ósseo, sendo denominado de lacuna de Howship. Essa ligação, ou mais apropriadamente, essa vedação, parece ser realizada por proteínas ósseas não-colagenosas específicas como a osteopontina, que contém a seqüência única de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) para permitir a adesão celular (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; KING e HOLTROP, 1975; REINHOLT, HULTENBY, OLDBERG *et al.*, 1990). Além desses fatores, proteínas da matriz óssea como a fibronectina, a osteopontina, a sialoproteína óssea e o próprio colágeno auxiliam na adesão do osteoclasto à superfície óssea (MIYAUCHI, ALVAREZ, GREENFIELD *et al.*, 1991; GRONOWICZ e MCCARTHY, 1995; KOBAYASHI, TAKAGI, SAKAI *et al.*, 1998).

Desde a sua descoberta como célula responsável pela absorção óssea por Kollinger em 1873, a origem dos osteoclastos permaneceu indefinida (KROON, 1954), até meados dos anos 70, quando se passou a considerar a origem hematopoiética a partir da fusão de precursores mononucleares (FISCHMAN e HAY, 1962; BURGER, VAN DER MEER, VAN DER GEVEL *et al.*, 1982; NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986). Embora a natureza precisa do processo de diferenciação dos osteoclastos não tenha sido completamente

esclarecida, acredita-se que a pressão fisiológica sobre o tecido ósseo possivelmente estimule o processo (BARON, NEFF, TRAN VAN *et al.*, 1986).

Algumas pesquisas propõem que os osteoclastos advêm de um progenitor hematopoiético que origina a colônia monocítica-macrofágica estimulado por uma classe de fatores de crescimento, sendo que provavelmente a partir de um progenitor mielóide oriundo da colônia, ocorre a diferenciação para a linhagem dos osteoclastos, independente da formação dos macrófagos e monócitos (FISCHMAN e HAY, 1962; NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; KURIHARA, SUDA, MIURA *et al.*, 1989; JIMI, SHUTO e KOGA, 1995).

Os agentes que regulam a replicação e a diferenciação dos precursores mielóides (colônia monocítica-macrofágica) são definidos como fatores estimuladores de colônia (CSFs) que provavelmente também atuam na comunicação do sinal absortivo do osteoblasto para o osteoclasto. Quatro fatores principais relacionados com os tecidos hematopoiéticos foram descritos, a interleucina-3 (IL-3 ou multi-CSF), o fator estimulador de colônia monocítica-macrofágica (GM-CSF), o fator-1 ou estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de colônia granulocítica (G-CSF). Acredita-se que particularmente o GM-CSF e a IL-3 possam regular o desenvolvimento dos osteoclastos a partir de precursores na medula óssea, sem afetar a célula madura (LORENZO, SOUZA, FONSECA *et al.*, 1987; JIMI, SHUTO e KOGA, 1995).

Os fatores estimuladores de colônias, essenciais para a diferenciação celular, são sintetizados por uma variedade de células. A GM-CSF, por exemplo, é uma glicoproteína sintetizada por células T, macrófagos, células

endoteliais, osteoblastos e fibroblastos e sua produção pode ser induzida por hormônios como o PTH e lipopolissacarídeos bacterianos. Alguns fatores como M-CSF ou o G-CSF regulam não somente a proliferação e diferenciação dos progenitores hematopoiéticos, mas também a função de granulócitos e macrófagos (JIMI, SHUTO e KOGA, 1995).

A formação dos osteoclastos funcionalmente ativos é um processo que basicamente inclui proliferação, diferenciação e fusão celular a partir de pré-osteoclastos iniciais, células proliferativas circulantes no sangue, sensíveis à radiação, sem atividade de fosfatase ácida e difícil de serem reconhecidas morfológicamente por técnicas tradicionais. Essas células dão origem, por sua vez, aos pré-osteoclastos tardios que são células pós-mitoses, representantes do último estágio na formação dos osteoclastos, que então, passam a se alojar no osso, a apresentar antígenos de superfície característicos e a se tornar uma célula multinucleada. Entretanto, a capacidade de absorção óssea só se manifesta com o desenvolvimento da borda em escova (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; YOKOYA, SASAKI, SHIBASAKI *et al.*, 1997). As células chamadas de pós-osteoclastos, são células mononucleares resultantes da desintegração dos osteoclastos, sendo que permanece sem resposta a possibilidade dessas células poderem reiniciar novo ciclo de atividade, pela fusão, após o estímulo apropriado (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; MUNDY, 1999).

Como célula adulta e madura, a principal função do osteoclasto é a absorção da matriz óssea extracelular calcificada, promovendo a dissolução mineral e a degradação final das moléculas da matriz, através da ação das enzimas lisossomiais liberadas na borda em escova (VIGNERY e BARON,

1980; TRAN VAN, VIGNERY e BARON, 1982; BARON 1989; MAJESKA, RYABY e EINHORN, 1994).

A absorção óssea é um intrincado processo que implica no recrutamento de osteoclastos precursores para o sítio de absorção local, para sua diferenciação em células multinucleares, com o desenvolvimento de duas estruturas importantes, a zona clara que permite a adesão da célula à superfície óssea e a borda em escova, sítio ativo de absorção (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; BARON, 1989; MUNDY, 1991). Seguem-se ações controladas e seqüenciais de solubilização da porção mineral do osso e hidrólise das fibras colágenas. Mas ainda restam dúvidas a respeito do processo de absorção óssea, principalmente de como ocorre a degradação da matriz colagenosa (BARON, NEFF, LOUVARD *et al.*, 1985; BLAIR, KAHN, CROUCH *et al.* 1986; BARON, 1989).

Para que ocorra a dissolução mineral, há necessidade do transporte ativo de íons hidrogênio (H^+) para do compartimento criado após a adesão da zona clara ao osso, fenômeno que envolve a participação de um tipo específico de bomba de prótons ATP-dependente. Esse sistema de transporte ativo de íons H^+ é movido através da energia obtida com a hidrólise do ATP (trifosfato de adenosina) em ADP (adenosina difosfato) (VÄÄNÄNEN, KARHUKORPI, SUNDQUIST *et al.*, 1990; YOKOYA, SASAKI, SHIBASAKI, 1997). Embora ácidos orgânicos, como o lático e o cítrico, sejam referidos como importantes nesse evento, a produção de ácido carbônico destaca-se (BARON, NEFF, LOUVARD *et al.*, 1985; SIQUEIRA e DANTAS, 1996). O dióxido de carbono (CO_2) no interior da célula, sob a influência da enzima anidrase carbônica, combina-se com a água para formar ácido carbônico, o qual se dissocia em

íons bicarbonato, secretados pela membrana basolateral, e íons H^+ , bombeados pela enzima ATPase (adenosina trifosfatase) para a o espaço subosteoclástico, favorecendo o decréscimo do pH para 3.5 a 4.0 (BARON, NEFF, LOUVARD *et al.*, 1985; SILVER, MURRILLS e ETHERINGTON, 1988; VÄÄNÄNEN, KARHUKORPI, SUNDQUIST *et al.*, 1990). Os íons cálcio (Ca^{+2}) liberados são transferidos, por meios de bombas iônicas, do fluido ósseo para o fluido extracelular (BARON, 1989; ROBERTS, 1996).

Com a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, a fase orgânica do osso é exposta (BARON, NEFF, LOUVARD *et al.*, 1985; VÄÄNÄNEN, KARHUKORPI, SUNDQUIST *et al.*, 1990; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991). O colágeno tipo I é possivelmente degradado por hidrolases ácidas ou collagenases (BLAIR, KAHN, CROUCH *et al.*, 1986; GOTO, TSUKUBA, AYASAKA *et al.*, 1992). Os osteoclastos são ricos em enzimas lisossomiais contendo fosfatases ácidas semelhantes às hidrolases ácidas, como a arilsulfatase, a beta-glicerofosfatase, a beta-glucuronidase e as catepsinas dos tipos C, B, L, D e G, entretanto existem dúvidas a respeito de sua atividade collagenolítica (BARON, NEFF, BROWN *et al.*, 1988; BARON, 1989; KEELING, KING, McCOY *et al.*, 1993; SASAKI e MATSUDA, 1993).

Sabe-se que as metaloproteinases, que fazem parte de uma grande família de proteinases zinco-cálcio dependentes, também são responsáveis pelo remodelamento e degradação dos componentes da matriz orgânica, como o próprio colágeno e a fibronectina, entre outras proteoglicanas. A presença de collagenases no osso em absorção, mas não dentro dos osteoclastos, já foi identificada, demonstrando sua participação na digestão da matriz óssea, embora não esteja claro se sua ação ocorre na área da borda em escova ou

apenas na degradação da camada osteóide não-mineralizada, para permitir a atividade osteoclástica (EVERTS, DELAISSÉ, KORPER *et al.*, 1992; DELAISSÉ, EECKHOUT, NEFF *et al.*, 1993).

Segundo SILVER e colaboradores (1988), os osteoclastos são incapazes de sintetizar collagenases neutras, além disso, como essas enzimas agem em pH neutro não seriam eficazes no local de absorção óssea (BLAIR, KAHN, CROUCH *et al.*, 1986). DELAISSÉ e colaboradores (1993) usando anticorpos demonstraram a presença de procollagenase tanto nos osteoclastos como na borda em escova, sugerindo que a ativação dessa enzima ocorreria durante ou após a desmineralização da matriz. A partir desses dados, considera-se a hipótese de que as enzimas lisossomiais poderiam agir em conjunto com collagenases na remoção da matriz óssea após a solubilização da porção mineral, aumentando o espectro do pH no qual a degradação da matriz poderia ocorrer (BLAIR, KAHN, CROUCH *et al.*, 1986; SILVER, MURRILLS e ETHERINGTON, 1988; EECKHOUT, 1990; EVERTS, DELAISSÉ, KORPER *et al.*, 1992). É importante citar que o aumento da concentração dos íons Ca^{+2} favorece a ação de collagenases neutras. Esse mecanismo sinérgico pode explicar o acúmulo de colágeno sob os osteoclastos na presença de inibidores para collagenases e cisteína-proteinases (EVERTS, DELAISSÉ, KORPER *et al.*, 1992; DELAISSÉ, EECKHOUT, NEFF *et al.*, 1993). Provavelmente, os osteoblastos e fibroblastos, fontes de collagenases, podem agir de modo integrado na degradação do colágeno, explicando a continuidade da remoção da matriz mesmo após a saída dos osteoclastos (DELAISSÉ, EECKHOUT, NEFF *et al.*, 1993).

A ação das collagenases manifesta-se também na degradação dos feixes de fibras colágenas desmineralizados deixados pelos osteoclastos quando estes abandonam o sítio de absorção (DELAISSÉ, EECKHOUT, NEFF *et al.*, 1993).

2.1.3.3 Eventos seqüenciais no remodelamento ósseo

De acordo com TRAN VAN e colaboradores (1982), a cinética do remodelamento ósseo demonstra que após a aplicação de força, uma única onda de osteoclastos aparece em torno de 3 dias no sítio de absorção, alcançando o pico entre 4 a 5 dias, sendo que em média a fase absorptiva dura cerca de 10 dias (TSAY, CHEN e OYEN, 1999). Os eventos específicos que se seguem a essa fase são o desmembramento dos osteoclastos em células mononucleares e a atração dos osteoblastos, provavelmente mediada por fatores locais produzidos durante a absorção, para formação de novo osso e reparo das lacunas de absorção (BARON, 1989; MUNDY, 1999).

O contínuo remodelamento do osso alveolar promove temporária perda da adesão em determinadas áreas do ligamento periodontal, mas a rápida síntese de fibras colágenas pelos fibroblastos e a produção de osso alveolar pelos osteoblastos promovem a restituição da ligação nesses locais (KURIHARA e ENLOW, 1980 b).

KURIHARA e ENLOW (1980 a), através de estudos de ME, citam que existem diferentes tipos de adesões entre as fibras periodontais e o osso alveolar recém absorvido. O tipo de religação que melhor se correlaciona com as clássicas descrições do mecanismo de reconstituição do ligamento

periodontal durante o movimento dentário é o contínuo, quando após a saída do osteoclasto da lacuna de absorção, toda a matriz fibrosa foi absorvida, com completa destruição e rompimento da ancoragem das fibras colágenas, levando à perda da continuidade fibrilar. A religação das fibras é feita através da substância fundamental amorfa depositada por células semelhantes a fibroblastos ou osteoblastos.

À medida que esse processo prossegue, as novas fibras formadas, embebidas na matriz amorfa e as terminações das fibras dissociadas no estroma do ligamento voltam a se religar. Esse tipo de conexão e reconexão acompanha a frente de absorção, com a substância amorfa tendo papel especial na adesão das superfícies ósseas absorvidas e como agente de ligação das fibras (REITAN e RYGH, 1996). Em alguns casos, podem permanecer prolongamentos intactos de fibras colágenas que passam a fazer parte do ligamento periodontal propriamente dito (KURIHARA e ENLOW, 1980 a). Entretanto, não se conhece com detalhes o mecanismo envolvido na manutenção da continuidade da adesão fibrosa entre o ligamento e a superfície de absorção do osso alveolar, ou como ocorrem as sucessivas religações das fibras colágenas nessa superfície (KURIHARA e ENLOW, 1980 a).

Na superfície óssea de deposição, por outro lado, a camada de osteóide depositada incorpora progressivamente as fibras periodontais ancoradas no antigo osso alveolar, sem haver qualquer solução de continuidade entre a matriz fibrosa e o estroma do ligamento periodontal (KRAW e ENLOW, 1967).

Todo esse processo parece depender da presença de células do tecido conjuntivo associadas aos osteoclastos. Essas células têm sido caracterizadas como pré-osteoblastos ou fibroblastos, sendo denominadas de células

companheiras. O específico papel dessas células permanece indefinido, podendo agir na digestão das fibras colágenas, ou na promoção da adesão ou da continuidade das reconexões entre as novas fibrilas na superfície óssea absorvida (GARANT, 1976; KURIHARA e ENLOW, 1980 a, b). Segundo KURIHARA e ENLOW (1980 b), essa célula de formato alongado, núcleo oval, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, passa a ocupar a lacuna de Howship imediatamente após a saída do osteoclasto, depositando substância amorfa e secretando novas fibras embebidas nessa substância, estabelecendo a ancoragem fibrosa.

2.2 FATORES REGULADORES DO REMODELAMENTO ÓSSEO

Vários trabalhos já demonstraram que as cargas mecânicas têm papel importante no remodelamento ósseo (SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.* 1980; HARTER, HRUSKA e DUCAN, 1995). O estímulo mecânico é considerado essencial para manutenção do remodelamento ósseo fisiológico do osso alveolar, mas talvez pela dificuldade de se controlar os fatores sistêmicos que atuam sobre o metabolismo ósseo, se comparados ao fator mecânico, pouca atenção foi dada sobre sua influência na movimentação dentária (BAUMRIND, 1969; MIDGETT, SHAYE e FRUGE, 1981).

Entretanto, com o avanço das pesquisas utilizando culturas de células, auto-radiografias com marcadores, imunocitoquímica com uso de anticorpos para o estudo das células e enzimas usadas como reagentes de controle nos métodos histoquímicos, características intrincadas do metabolismo ósseo estão sendo desvendadas e as respostas das células ósseas aos mais variados

agentes químicos até então, obscuras, progressivamente, esclarecidas (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; YAMAGUCHI, SHIMIZU, GOSEKI *et al.*, 1994; TAKAGAKI, SUZUKI, KAWASE *et al.*, 1996; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, tem-se estudado extensivamente a participação de componentes intracelulares como o PTH, a calcitonina, o metabólito 1,25 DHCC, as citocinas, as prostaglandinas (PGs), os corticoesteróides, a insulina e os fatores de crescimento, na geração e na atividade das células ósseas (BLAIR, KAHN, CROUCH *et al.*, 1986; HOROWITZ, COLEMAN, FLOOD *et al.*, 1989; LACEY, GROSSO, MOSER *et al.*, 1993; ROBERTS, 1996).

Uma importante etapa na compreensão do metabolismo ósseo é a descoberta dos elementos intracelulares que atuam na comunicação e na sinalização celular, a partir da ação primária de uma substância, geralmente um hormônio, ou pela aplicação de forças mecânicas, resultando em resposta biológica (MEGHJI, 1992; CARANO e SICILIANI, 1996; CARVALHO, BUMANN, SCHWARZER *et al.*, 1996).

Como modelo de sinalização celular, destaca-se o sistema de proteínas receptoras presentes na membrana das células (HYNES, 1987; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997). Como a maioria das moléculas sinalizadoras extracelulares é de natureza hidrofílica, a exemplo dos hormônios peptídeos (PTH e calcitonina), das PGs, dos neurotransmissores e dos fatores humorais, estas se ligam a receptores presentes na superfície das células, os quais atuam como transdutores, transformando o sinal externo em resposta intracelular. Já os hormônios esteróides (cortisol e hormônios sexuais), tireoidianos, retinóides e a vitamina D são moléculas pequenas e hidrofóbicas

que atravessam facilmente a membrana plasmática das células, podendo se ligar aos receptores intracelulares que regulam a transcrição de genes específicos (STRYER, 1992; REITAN e RYGH, 1996; ALBERTS, BRAY, LEWIS, *et al.*, 1997). Entretanto, tal situação não existe quando as células ósseas são submetidas à aplicação de cargas mecânicas (MEGHJI, 1992), permanecendo a questão de como ocorre o mecanismo para transdução do estímulo mecânico em reação celular (SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.* 1980; ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981).

Três tipos principais de receptores celulares devem ser mencionados, os receptores associados aos canais iônicos, os receptores associados às enzimas e, principalmente, os receptores associados à proteína G, denominação que se refere ao nucleotídeo guanílico. Esses receptores, através de reações em cascata, têm a capacidade de alterar a concentração das moléculas sinalizadoras, chamadas de mensageiros secundários, sendo que dois dos mais largamente conhecidos são o íon Ca^{2+} e o nucleotídeo adenosina 3', 5' monofosfato cíclico (AMPC) (SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986; STRYER, 1992; ALBERTS, BRAY, LEWIS *et al.*, 1997). Esses mensageiros se ligam a proteínas específicas na célula, alterando sua conformação e conseqüentemente sua atividade (WANNMACHER e FERREIRA, 1999). Outros segundos mensageiros conhecidos são o guanosina 3', 5' monofosfato cíclico (GMPc), 1,2 diacilglicerol e o inositol 1, 4, 5-trifosfato (ALBERTS, BRAY, LEWIS *et al.*, 1997).

Uma das hipóteses mais aceita é que as células respondem às forças mecânicas aplicadas através da distorção da sua forma, ou indiretamente pela interação dos receptores transmembrana mencionados anteriormente, com as

moléculas extracelulares e também pelo fluxo de íons, fazendo o elo de ligação entre a deformação da matriz extracelular na qual as células estão envolvidas e a função celular propriamente dita, mediada através da ação intracelular dos nucleotídeos cíclicos, principalmente o AMPc (ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; LILJA, LINDSKOG e HAMMARSTRÖM, 1983; MEGHJI, 1992; SANDY, FARNDAL e MEIKLE, 1993).

O conhecimento das funções do AMPc como segundo mensageiro no sistema de transmissão celular está bem ilustrado na literatura. Ele é sintetizado a partir do ATP pela enzima adenil ciclase ligada à membrana plasmática através da proteína G, sendo rápido e continuamente destruído por fosfodiesterases que o transformam em adenosina 5' monofosfato (5'-AMP), o que permite a regulação de sua concentração intracelular. A cascata da adenilciclase que inclui a formação do AMPc, é grandemente responsável pela amplificação dos sinais hormonais (CHEUNG, 1970; STRYER, 1992).

Os nucleotídeos cíclicos apresentam várias funções como o controle da abertura de canais iônicos na membrana das células, a regulação das reações metabólicas e dos processos de diferenciação e divisão celular, consistindo num dos mais versáteis sistemas de transdução dos sinais externos em reações intracelulares (STRYER, 1992; ALBERTS, BRAY, LEWIS *et al.*, 1997). O PTH e as prostaglandinas, por exemplo, estão particularmente associados à ação do AMPc (KLEIN e RAISZ, 1971; RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975; YAMASAKI, 1983).

Atualmente, acredita-se que no processo de remodelamento ósseo o tecido atue como um agente estímulo-receptor, onde a distorção da membrana celular produzida por perturbação mecânica, elétrica ou química inicia eventos

específicos através da modulação dos nucleotídeos cíclicos que, então, agem como moléculas regulatórias na citodiferenciação requerida para essa atividade (RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975; ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981).

A flutuação dos níveis dos nucleotídeos determina seus efeitos no ambiente intracelular. Em cultura de células semelhantes a fibroblastos, a redução dos níveis do AMPc está correlacionado ao estímulo no aumento do número de mitoses ou ao crescimento celular. Por outro lado, elevações na taxa de AMPc em células ósseas e macrófagos são precedidas de elevações nas concentrações de prostaglandinas, do PTH e da calcitonina (PECK, CARPENTER e MESSINGER, 1974; SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.*, 1980; CHAMBERS, McSHEEHY, THOMPSON *et al.*, 1985). Entretanto, um dos principais problemas no estudo da influência metabólica dos nucleotídeos cíclicos é a dificuldade na mensuração da flutuação de seus níveis (BROOKER, THOMAS e APPLEMAN, 1968; FROEHLICH e RACHMELER, 1972; SHANFELD, JONES, LASTER, *et al.*, 1986; ASSENDER, SOUTHGATE, HALLETT *et al.*, 1992).

A atividade das células ósseas seria, então, regulada por agentes que afetam as atividades de proliferação e diferenciação celular, seja estimulando ou inibindo. Agentes primários como o PTH, a vitamina D, a IL-1, a IL-6, e o TNF- α atuam no estímulo à absorção óssea, enquanto a calcitonina, o fator de crescimento transformante- β , o interferon gama (INF- γ) e o estrogênio inibem a atividade dos osteoclastos (MEGHJI, 1992).

RODAN e MARTIN (1981) consideraram os osteoblastos células essenciais no remodelamento, atuando tanto na preparação da superfície óssea para a absorção, como regulando a função dos osteoclastos, através da produção de mediadores químicos requeridos para a ativação dessas células. Substâncias como o PTH, a vitamina D e as PGs só afetam os osteoclastos indiretamente, através de receptores presentes na linhagem das células osteoblásticas, apesar das células clásticas possuírem receptores para a calcitonina, para o estrogênio e para a maioria das citocinas (RODAN e MARTIN, 1981; McSHEEHY e CHAMBERS, 1986; MEGHJI, 1992).

A Ortodontia e a Ortopedia Dento-Facial dividem grande interesse nos aspectos biomecânicos da fisiologia óssea, principalmente pelo fato de sua abordagem terapêutica estar baseada na aplicação de forças mecânicas aos dentes e ao esqueleto facial (CARANO e SICILIANI, 1996). As pesquisas atuais têm demonstrado que a aplicação de um sistema de forças sobre os dentes produz fenômenos biofísicos e bioquímicos no periodonto e osso alveolar, que combinados entre si caracterizam as complexas transformações que controlam o remodelamento ósseo durante o movimento dentário (ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; VAN DE VELDE, KUITERT, VAN GINKEL *et al.*, 1988). A interação parece ocorrer entre a aplicação do estímulo mecânico sobre as células do periodonto e osso alveolar, com a produção de fatores locais como PGs, leucotrienos (LTs), citocinas, fatores de crescimento que ativam as células ósseas, resultando na absorção e na formação óssea (SAITO, SAITO, NGAN *et al.*, 1991; CARANO e SICILIANI, 1996; SCHEIJMANS, DIEUDONNÉ, ANDERSEN *et al.*, 1996).

Em virtude do crescente conhecimento da atuação dos mediadores químicos, as pesquisas ortodônticas também se têm voltado para a possibilidade do uso terapêutico de certas substâncias durante o tratamento ortodôntico (YAMASAKI, MIURA e SUDA, 1980; COLLINS e SINCLAIR, 1988; GRIEVE, JOHNSON, MOORE *et al*, 1994).

O PTH tem sido um dos fatores mais estudados quanto aos seus efeitos na formação e ação dos osteoclastos. O PTH é potente estimulador da absorção óssea tanto *in vitro* como *in vivo*. Seu efeito parece ser alcançado pela ativação de osteoclastos já existentes, aumentando a taxa de absorção óssea e pelo estímulo ao desenvolvimento de novas células. Porém, o exato mecanismo de ação não está esclarecido, restando dúvidas sobre sua influência nas células progenitoras dos osteoclastos (GIANELLY e SCHNUR, 1969; KLEIN e RAISZ, 1970; McSHEEHY e CHAMBERS, 1986; NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986).

De um modo geral, o PTH provoca alterações na morfologia dos osteoclastos, aumentando o número de projeções da borda em escova e, assim, a eficiência na absorção óssea (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974). A taxa de cálcio sérico é elevada consideravelmente após a aplicação desse hormônio, efeito que parece ser mediado pela cascata da adenil ciclase e, conseqüentemente através da participação do AMPc, fato que pode ser indiretamente evidenciado pela aplicação de inibidores efetivos da fosfodiesterase, como a teofilina (KLEIN e RAISZ, 1971; JILKA e COHN, 1981). Nesses estudos, a teofilina estimula a mobilização do Ca^{2+} mesmo numa baixa concentração de PTH, ineficaz em condições fisiológicas para provocar absorção óssea.

A ação do PTH sobre os osteoblastos interfere marcadamente com a atividade osteogênica ao inibir a síntese de colágeno e a ação da fosfatase alcalina (DIETRICH, CANALIS, MAINA *et al*, 1976; KREAM, ROWE, GWOREK *et al.*, 1980). Mas ele também pode agir estimulando a aposição óssea, independentemente de sua ação absorviva (TAM, HEERSCHKE, MURRAY *et al.*, 1982). As variadas respostas dos osteoblastos à ação do PTH podem ser devidas tanto à idade ou espécie animal utilizada no experimento, ou ainda pela concentração e duração de sua administração, como quanto ao estágio celular de diferenciação da célula-alvo (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; MEGHJI, 1992).

A forma ativa da vitamina D (colecalfiferol), o esteróide 1,25 DHCC, é um hormônio de grande complexidade quanto à síntese e curso metabólico, sendo essencial para o crescimento ósseo normal e para a mineralização, com efeitos paradoxais no remodelamento ósseo, além de exercer papel fundamental na regulação da absorção intestinal de cálcio e fósforo e na excreção renal dessas substâncias (NORMAN, 1968; ROBERTS, 1996).

Entre os efeitos do metabólito 1,25 DHCC destaca-se sua ação como regulador da diferenciação e fusão das células progenitoras, favorecendo o aumento do número de osteoclastos no tecido ósseo (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; MEGHJI, 1992). Além dessas ações, o 1,25 DHCC aumenta o bombeamento de íons cálcio para o fluido extracelular e, posteriormente, para a corrente sangüínea, a partir das camadas de células ósseas, cujo transporte inicial do fluido ósseo foi realizado pelo PTH, possivelmente num mecanismo sinérgico (ROBERTS, 1996). Sua ação sobre os osteoclastos também é exercida de modo indireto, pelas células da linhagem osteoblástica, através de

receptores protéicos intracelulares, no citosol e no núcleo dessas células (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; McSHEEHY e CHAMBERS, 1986; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997).

Os efeitos da vitamina D sobre os osteoblastos ainda não foram totalmente definidos, havendo resultados conflitantes entre o estímulo e a inibição. Um dos efeitos já esclarecido é o aumento da síntese de osteocalcina e osteopontina, embora a vitamina D suprima a síntese de colágeno (SODEK e McKEE, 2000). Segundo vários trabalhos científicos esses efeitos parecem depender do estágio de diferenciação das células ósseas (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986; MEGHJI, 1992). De acordo com COLLINS e SINCLAIR (1988), a aplicação do metabólito da vitamina D resulta em maior movimentação dentária, porém sem efeito inibitório sobre os osteoblastos, ocorrendo aposição óssea normal.

Os glicocorticóides são hormônios sintéticos que mimetizam as ações do cortisol endógeno secretado pela zona cortical da glândula adrenal, e seus efeitos sobre o metabolismo ósseo são complexos. Os glicocorticóides exercem efeitos antagônicos sobre a função dos osteoblastos. Embora inicialmente possam estimular a diferenciação dos osteoblastos, o tratamento em longo prazo pode interferir com a síntese do colágeno e de proteínas ósseas, como a osteocalcina e osteopontina, além de prejudicar a ação enzima fosfatase alcalina, alterando assim a biossíntese da matriz óssea e diminuindo a massa óssea (DIETRICH, CANALIS, MAINA *et al.*, 1979; GRONOWICZ e McCARTHY, 1995).

Um dos efeitos mais marcantes dos glicocorticóides na função e formação óssea é a inibição da proliferação dos pré-osteoblastos, além da

diminuição do número de osteoblastos dispostos sobre a superfície óssea, o que provavelmente contribui para a diminuição da calcificação (GRONOWICZ e McCARTHY, 1995). Esse afastamento dos osteoblastos da superfície óssea parece estar associado à alteração na expressão das integrinas, proteínas transmembrana fundamentais para a interação dos osteoblastos à matriz óssea extracelular (HYNES, 1987; GRONOWICZ e McCARTHY, 1995).

Produtos bacterianos como lipopolissacarídeos, componente fundamental da membrana externa de bactérias Gram-negativas também estimulam a absorção óssea, estando implicados com a patogênese da doença periodontal pelo estímulo à expressão de fatores inflamatórios que promovem a absorção óssea, como as citocinas IL-1 e o TNF- α , e das PGs (MEGHJI, 1992; UEDA, NISHIHARA, ISHIHARA *et al.*, 1995; KOIDE, OKAHASHI, TANAKA *et al.*, 1999).

Os estrogênios são hormônios sexuais de caráter anabólico, particularmente indicados para reposição hormonal em mulheres pós-menopausa, com objetivo de diminuir a perda de massa óssea (MAJESKA, RYABY e EINHORN, 1994; MORISHITA, YAMAMURA, BACHCHU *et al.*, 1998). Eles podem regular o metabolismo ósseo por múltiplas vias, como através de sua interação com os osteoblastos (WILLMER, 1961; MORISHITA, SHIMAZU e IWAMOTO, 1999), estimulando a atividade osteogênica, a produção de colágeno e de proteínas ósseas, aumentando a síntese da enzima fosfatase alcalina e do fator de crescimento semelhante à insulina, o qual por sua vez, estimula a síntese de DNA nas células.

Outro modo de ação dos estrógenios seria através da diminuição da absorção óssea, pelo sistema de sinalização celular que existe entre os

osteoblastos e os osteoclastos, ou possivelmente, através dos receptores presentes nos osteoclastos (MAJESKA, RYABY e EINHORN, 1994; MORISHITA, YAMAMURA, BACHCHU *et al.*, 1998). Um efeito adicional dos estrogênios é a diminuição da responsividade das células ósseas aos hormônios que estimulam a absorção óssea como o PTH e a Prostaglandina E₂ (PGE₂), através da inativação seletiva da cascata da adenilciclase, efeito também modulado pelo AMPc (KLEIN e RAISZ, 1971; TANAKA, HAJI, TAKAYANAGI *et al.*, 1996).

As citocinas ou moléculas sinalizadoras peptídicas, produzidas pelos monócitos, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e osteoblastos, também são potentes mediadoras do metabolismo ósseo (MUNDY, 1991; MEGHJI, 1992). O fator ativador de osteoclastos (OAF) na verdade é uma citocina que pode estimular a diferenciação dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos em células funcionalmente ativas. As citocinas também agem sobre os osteoblastos, fazendo com que estes liberem fatores solúveis responsáveis pela diferenciação dos osteoclastos. As principais citocinas envolvidas com a absorção óssea são as interleucinas, os fatores de necrose tumoral e os fatores estimuladores de colônia. Algumas citocinas liberadas no microambiente ósseo, como o INF- γ , a interleucina-4 (IL-4) e o antagonista de receptor para IL-1 podem atuar diretamente no controle da absorção óssea (DAVIDOVITCH, NICOLAY, NGAN *et al.*, 1988; HOROWITZ, COLEMAN, FLOOD *et al.*, 1989; SAITO, SAITO, NGAN *et al.*, 1991, LACEY, GROSSO, MOSER *et al.*, 1993; MEGHJI, 1992; UEMATSU, MOGI e DEGUCHI, 1996)

As PGs, lipídios ácidos derivados da metabolização do ácido aracdônico pela enzima cicloxigenase, são um dos principais mediadores químicos do

remodelamento ósseo, podendo interagir com as citocinas IL-1 e o TNF, para aumentar inclusive sua própria produção (YAMAGUCHI, SHIMIZU, GOSEKI *et al.*, 1994; UEMATSU, MOGI e DEGUCHI, 1996). Elas podem estimular tanto a absorção óssea, nesse caso indiretamente, através dos osteoblastos, como inibir a ação dos osteoclastos, favorecendo a formação óssea (HARADA, NAGY, SULLIVAN *et al.*, 1994; FORWOOD, KELLY e WORTH, 1998). As PGs, principalmente as da série E e F, são potentes estimuladoras da absorção óssea, como nos casos da doença periodontal, trauma e doenças malignas (MENDIETA, REEVE e ROMERO, 1985; SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986).

As PGs não são os únicos metabólitos do ácido aracdônico que tem a capacidade de estimular a absorção óssea. Os leucotrienos (LTs), derivados da via da enzima lipoxigenase, também estimulam a absorção óssea (*in vitro*), e embora seu papel ainda seja desconhecido na absorção fisiológica e patológica, podem ser tão importantes como as PGs nas doenças inflamatórias crônicas envolvendo o tecido ósseo (MOHAMMED, TATAKIS e DZIAK, 1989; MEGHJI, 1992; MUNDY, 1999).

YAMASAKI (1983, 1989) propôs que após o estresse mecânico do ligamento periodontal ocorre a síntese de determinados mediadores químicos, principalmente das prostaglandinas, que induzem indiretamente, via osteoblastos, a elevação dos nucleotídeos cíclicos e do íon Ca^{2+} no ambiente intercelular de precursores de osteoclastos ou de osteoclastos maduros, de modo a modular e ativar a atividade osteoclástica resultando na absorção óssea e, conseqüentemente no movimento dentário ortodôntico.

Os efeitos das prostaglandinas sobre a movimentação dentária são os mais estudados. GOODSON e colaboradores (1974) mostraram que repetidas injeções de PGE_1 em ratos produziram marcadas mudanças na morfologia óssea, com aumento das áreas de absorção onde a droga foi infiltrada. A grande desvantagem da aplicação da prostaglandina é a dor associada com a administração local, além de seu rápido metabolismo (SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986; YAMASAKI, 1989; LEE, 1990). O efeito acelerador das PGs sobre o movimento dentário pode ser aferido também indiretamente pela administração de drogas antiinflamatórias que diminuem consideravelmente a taxa do movimento dentário (CHUMBLEY e TUNCAY, 1986; YAMASAKI, 1989; GIUNTA, KELLER, NIELSEN *et al.*, 1995). A administração local de osteocalcina em dentes submetidos à movimentação ortodôntica também pode aumentar a absorção óssea, pelo estímulo ao aparecimento de osteoclastos no lado de pressão (KOBAYASHI, TAKAGI, SAKAI *et al.*, 1998).

A calcitonina é um hormônio peptídeo sintetizado pelas células parafoliculares da tireóide. Sua rápida ação hipocalcêmica provoca redução no número dos osteoclastos, pela inibição da proliferação celular e através da desintegração das células, que voltam ao estágio mononuclear, abandonando a superfície óssea, com inativação e involução da borda em escova (KALLIO, GARANT e MINKIN, 1972; HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986).

O mecanismo de ação da calcitonina parece envolver a ativação de canais iônicos ou mais provavelmente a cascata da adenilciclase, estimulando o acúmulo de AMPc, com objetivo de provocar sinais no citosol para a inibição

da absorção óssea, mediante contração da membrana dos osteoclastos (RODAN e RODAN, 1974; ROBERTS, 1996).

A colchicina, alcalóide extraído da *Colchicum autumnale*, usada no tratamento da gota desde o tempo dos antigos egípcios, também é efetivo inibidor da absorção óssea *in vitro*, devido à sua ação direta sobre os osteoclastos (INSEL, 1996; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997). A colchicina é uma substância antimitótica, que interfere com a formação do fuso mitótico, e com o sistema de microtúbulos das células, responsável pela contração e deslocamentos celulares. Embora essa droga apresente efeitos semelhantes a calcitonina, seu mecanismo de ação não foi totalmente definido, podendo agir tanto sobre a diferenciação dos osteoclastos progenitores, como também pode afetar alguma função da membrana celular (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974; ALBERTS; BRAY, LEWIS *et al.*, 1997)

As propriedades antimicrobianas das tetraciclina têm enorme aplicação na Medicina e Odontologia, mas à parte desses efeitos, as tetraciclina são potentes agentes anticolagenolíticos e anti-absortivos do tecido conjuntivo, tornando sua indicação bastante atraente para o tratamento de periodontites, artrites e determinadas doenças ósseas caracterizadas por excessiva degradação das fibras colágenas. Os mecanismos pelos quais as tetraciclina e seus análogos químicos modulam a absorção óssea são complexos, afetando vários parâmetros da função osteoclástica e osteoblástica (VERNILLO e RIFKIN, 1998). As tetraciclina são capazes de inibir a absorção óssea ao interferir com a síntese ou secreção das metaloproteinases produzidas pelos osteoblastos e das enzimas catepsinas produzidas pelos osteoclastos. Estudos adicionais têm mostrado que as tetraciclina e seus análogos químicos afetam

o mecanismo de adesão celular na zona clara, num mecanismo associado ao aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular (CHAMBERS e FULLER, 1985; VERNILLO e RIFKIN, 1998). As tetraciclinas também reduzem o número de osteoclastos através da indução de apoptose ou morte celular programada (VERNILLO e RIFKIN, 1998).

A apoptose dos osteoclastos também é um efeito marcante dos bifosfonados para a redução da atividade absorptiva dos mesmos, sendo por isso, indicados para o tratamento de doenças que apresentam distúrbio do metabolismo ósseo, como a doença de Paget, a osteoporose e demais patologias ósseas que provocam hipercalcemia (MILLER e JEE, 1979; VERNILLO e RIFKIN, 1998). Atualmente, estuda-se a possibilidade terapêutica da aplicação desse medicamento para evitar a recidiva do movimento dentário e a inibição da absorção radicular (IGARASHI, ADACHI, MITANI *et al.*, 1996; KIM, YOSHIDA, YOKOYA *et al.*, 1999). Ao contrário das tetraciclinas que alteram o número de precursores osteoclásticos, os bifosfonados atuam somente sobre os osteoclastos maduros e ativos para reduzir a absorção óssea, sem interferir com a formação e recrutamento de osteoclastos precursores (VERNILLO e RIFKIN, 1998).

A vitamina K_2 tem sido particularmente indicada para o tratamento de doenças ósseas que provocam extensa absorção óssea, devido à sua ação seletiva e indução direta da apoptose dos osteoclastos, inibindo assim a atividade absorptiva (KAMEDA, MIYAZAWA, MORI *et al.*, 1996; OKAHASHI, NAKAMURA, JIMI *et al.*, 1997).

2.3 ABSORÇÃO RADICULAR ASSOCIADA AO TRATAMENTO ORTODÔNTICO

Durante o movimento fisiológico dos dentes, a largura do ligamento periodontal é mantida às custas do rápido ciclo de remodelamento das fibras colágenas, enquanto que camadas adicionais de cemento ajustam a orientação das fibras de Sharpey inseridas na raiz, sendo que raramente ocorre absorção cementária (ROBERTS e FERGUSON, 1989; LASFARGUES e SAFFAR, 1993; TEN CATE, 1994). Entretanto, a absorção das raízes dos dentes que ocorre como parte do processo natural de exfoliação dos dentes decíduos, também pode ocorrer em casos de traumas, ou durante o tratamento ortodôntico, ou ainda sem causa aparente. (RYGH, 1977; BARBER e SIMS, 1981; HARRY e SIMS, 1982; BREZNIAK e WASSERTAIN, 1993 a, b; LUPI, HANDELMAN e SADOWSKY, 1996).

Considera-se que a absorção radicular é realizada pelos odontoclastos, células morfológicamente similares aos osteoclastos, mas apresentando diferenças ultraestruturais e funcionais (LINDSKOG, BLOMLÖF e HAMMARSTRÖM, 1987 a; SASAKI, MOTEGI e SUZUKI, 1988; SAHARA, ASHIZAWA, NAKAMURA *et al.*, 1998). As características ultraestruturais e histoquímicas dos osteoclastos, compartilhadas pelos odontoclastos são a borda em escova, o fato de serem resistentes à incubação na presença de tartarato, a presença de múltiplos núcleos e de numerosas mitocôndrias, lisossomas e vacúolos citoplasmáticos (LASFARGUES e SAFFAR, 1993; SAHARA, ASHIZAWA, NAKAMURA *et al.*, 1998).

Os odontoclastos, por outro lado, não demonstram possuir a zona clara, seu aparecimento é mais tardio do que os osteoclastos e seu período de permanência nas lacunas de absorção radicular é menor (TANAKA, MORIOKA, AYASAKA *et al.*, 1990).

Apesar do grande número de estudos sobre os possíveis fatores causadores da absorção radicular durante o tratamento ortodôntico, como a duração da aplicação da força e sua magnitude, a severidade da maloclusão, o tipo de movimento desejado, o uso de elásticos intermaxilares ou de força extra-oral, nenhum destes mostraram-se conclusivos. Do mesmo modo, a idade, o sexo, as desordens endócrinas e nutricionais que o paciente apresente, assim como a estrutura radicular, a densidade do osso alveolar e a idade relativa do início da formação radicular na época do tratamento, provavelmente não são os determinantes do surgimento da absorção radicular (WAINRIGHT, 1973; REITAN, 1974; KALEY e PHILLIPS, 1991; BREZNIAK e WASSERTAIN, 1993 a, b; LUPI, HANDELMAN e SADOWSKY, 1996; LEE, ARTUN e ALONZO, 1999).

Sabe-se que o cemento é mais resistente à absorção do que osso, razão pela qual o movimento dentário ortodôntico é possível (BHASKAR, 1989). A própria presença de flúor na constituição do cemento contribui para sua dureza (DOMON, SHIMOKAWA, MATSUMOTO *et al.*, 1999). Mas a absorção radicular não é uma seqüela desconhecida do tratamento ortodôntico. WAINRIGHT (1973) e REITAN (1974) sugeriram que o movimento descontrolado do dente pode causar absorção radicular devido ao estresse gerado no ligamento periodontal, principalmente no movimento do dente contra a cortical óssea (HICKHAM, 1986). Não só a duração da força e sua magnitude são

importantes, mas o tipo de força aplicada também deve ser considerado, pois existem diferenças na resposta tecidual às forças contínuas e descontínuas (HARRY e SIMS, 1982; REITAN e RYGH, 1996). Forças contínuas, mantendo situação de constante pressão podem estar envolvidas com o mecanismo pelo qual o cimento e a dentina diminuem sua capacidade de resistir a absorção, (RYGH, 1977; REITAN e RYGH, 1996).

Segundo ACAR e colaboradores (1999), os períodos de quiescência na aplicação de forças descontínuas permitem reparo das lacunas de absorção formadas na superfície cementária, provavelmente associadas às áreas hialinizadas, favorecendo a reconstituição do suprimento vascular dos tecidos de suporte periodontais e também, a proliferação celular.

Normalmente, os tecidos cementóide e a própria pré-dentina, não calcificados, resistem à pressão contínua. Entretanto, quando ocorre uma fenda nessa camada formativa, as células clásticas são atraídas e passam a ter acesso à fase mineralizada da raiz, absorvendo a estrutura radicular (BARBER e SIMS, 1981; LANGFORD e SIMS, 1982; BRUDVIK e RYGH, 1993 a). Geralmente as zonas hialinizadas precedem à absorção radicular, onde células semelhantes aos macrófagos fagocitam o tecido necrótico hialinizado. Em torno de 3 a 4 dias, a superfície radicular coberta por restos teciduais do ligamento periodontal, sob necrose de coagulação, sofre o ataque de fibroblastos e cementoblastos que através de atividade fagocítica e colagenolítica, rompem a barreira cementóide, e os odontoclastos, passam então, a dissociar a fase mineral do cimento e dentina (RYGH, 1977; BREZNIAK e WASSERTAIN, 1993 a; BRUDVIK e RYGH, 1993 b; BRUDVIK e RYGH, 1994 a, b).

De acordo com RYGH (1977), assim que a lacuna é definida, a absorção prossegue caso a aplicação da força ortodôntica seja mantida, mesmo se o tecido hialinizado já tiver sido eliminado. Por outro lado, se a força ortodôntica for interrompida, ou decrescer a nível fisiologicamente aceitável, as lacunas são reparadas. Associada à absorção, pode ocorrer simultaneamente aceleração da formação dentinária, a fim de prevenir excessivo afinamento da raiz. A obliteração pulpar pode ser uma seqüela dessa acentuada deposição (DELIVANIS e SAUER, 1982).

ANDREASEN (1973) definiu três tipos de absorção radicular: a de superfície, a inflamatória e a de substituição. A absorção que acomete a raiz pós-tratamento ortodôntico é de superfície ou inflamatória, de caráter transitório, onde geralmente o dano é mínimo e por curto período de tempo. Zonas estreitas e pouco profundas são prontamente preenchidas por cemento reparativo, freqüentemente do tipo celular, proveniente do repovoamento local por células semelhantes aos cementoblastos, cuja indução parece ocorrer a partir da população de células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento periodontal (ROBERTS e FERGUSON, 1989), havendo ao final do processo a inserção das fibras colágenas na estrutura cementária reconstituída (SISMANIDOU, HILLIGES e LINDSKOG, 1996).

A mineralização começa ao redor das fibras inseridas nas lacunas e à medida que o processo de reparo progride, as depressões se tornam totalmente mineralizadas com as fibras incorporadas à matriz de cemento (BARBER e SIMS, 1981; LANGFORD e SIMS, 1982). O reparo pode durar de 35 a 70 dias após a aplicação da força ortodôntica (BREZNIAK e WASSERTAIN, 1993 a). Se as depressões são profundas, o contorno

anatômico original da raiz é prejudicado. A remoção maior que um quarto do ápice radicular, muito comum nos incisivos superiores, é denominada absorção radicular externa (BREZNIAK e WASSERTAIN, 1993 a; McNAB, BATTISTTUTTA, TAVERNE *et al.*, 1999). Subseqüente à cicatrização da lacuna, ocorre o restabelecimento dos tecidos nervosos e vasculares (SISMANIDOU, HILLIGES e LINDSKOG, 1996).

SASAKI e colaboradores (1988) sugeriram que a absorção radicular acontece de modo semelhante à óssea. DOMON e colaboradores (1999) mostraram que as metaloproteinases estão presentes nos cementoblastos, cementócitos e fibroblastos adjacentes à superfície radicular, enquanto que proteinases lisossômicas cisteínicas também estão expressas no ácido ribonucléico mensageiro dos osteoclastos e odontoclastos nas áreas de absorção radicular, definindo elos de ligação das células formativas e absorptivas ósseas e cementárias.

Apesar das semelhanças, os osteoclastos e odontoclastos não respondem aos mesmos mecanismos de diferenciação e ativação, visto que diferente dos osteoclastos, o PTH não modifica a morfologia dos odontoclastos durante a absorção fisiológica da raiz dos dentes decíduos (FREILICH, 1971) e a absorção radicular não aumenta nos casos de hiperparatireoidismo (LASFARGUES e SAFFAR, 1993). LINDSKOG e colaboradores (1987b) demonstraram não existir efeito na morfologia dos cementoblastos, com a administração de PTH, ao passo que os osteoblastos apresentaram espaços intercelulares bastante aumentados. Isto sugere que os cementoblastos não expressam receptores funcionais para o PTH, ao contrário dos osteoblastos (McSHEEHY e CHAMBERS, 1986), embora a presença da PGE₂ contribua

para a absorção radicular (YAMASAKI, SHIBATA, IMAI *et al.*, 1984; BRUDVIK e RYGH, 1991; BOEKENOOGEN, SINHA, NANDA *et al.*, 1996).

De acordo com SASAKI e colaboradores (1988), os cementoblastos controlam as modificações da superfície radicular que levam à absorção, porém são insensíveis aos sistemas indutores do remodelamento ósseo, explicando o porquê dos tecidos radiculares escaparem à ação dos reguladores sistêmicos do cálcio. Os receptores para o EGF, presentes nos cementoblastos, podem estar envolvidos com a formação do cimento reparador das áreas absorvidas (SISMANIDOU, HILLIGES e LINDSKOG, 1996).

Permanece como desafio a identificação dos fatores biológicos e mecânicos responsáveis pelo estímulo e inibição do reparo da superfície radicular, especialmente nos casos de absorções causadas pelo movimento dentário ortodôntico. A elucidação desse mecanismo certamente tornaria o tratamento ortodôntico mais seguro (McNAB, BATTISTTUTA, TAVERNE *et al.*, 1999). Nos últimos anos, o papel específico do sistema imune nas absorções radiculares mediada pela produção de anticorpos e a própria regulação humoral da absorção têm sido investigados, diante da suspeita de que esse tipo de absorção esteja associado a algum mecanismo auto-imune (KING e COURTS, 1989, 1990).

2.4 OS BENZODIAZEPÍNICOS E O MOVIMENTO ORTODÔNTICO

O homem tem procurado, através de toda a história, agentes químicos capazes de modificar os efeitos do estresse e das sensações de desconforto, tensão, ansiedade e disforia. Muitos desses esforços levaram ao desenvolvimento de agentes farmacológicos, geralmente, classificados como sedativos. É importante frisar que a ansiedade não é primariamente doença ou sintoma de doença, mas sim uma emoção básica, essencial ao desempenho adequado do homem. Se muito intensa ou duradoura, prejudica esse mesmo desempenho e exige intervenção terapêutica (HAFFNER, MORLAND, SETEKLEIV *et al.*, 1973; BALDESSARINI, 1996; WANNMACHER e FERREIRA, 1999).

A ansiedade não pode ser explicada facilmente em termos biológicos e psicológicos. Várias hipóteses sugerem hiperatividade dos sistemas adrenérgicos no sistema nervoso central (SNC). Seus sintomas mais graves abrangem quadro psiquiátrico mais amplo que inclui depressão, distúrbios do humor, distúrbios de personalidade, fobias generalizadas e tendências à somatização. Nessas circunstâncias, os ansiolíticos, também chamados genericamente de sedativos, são freqüentes e adequadamente prescritos (BALDESSARINI, 1996; RALL, 1996).

Os sedativos com efeitos ansiolíticos estão constantemente entre os fármacos mais prescritos. Inúmeros desses sedativos-hipnóticos agem sobre o SNC produzindo calma, tranquilidade ou sonolência (sedação), sono (hipnose farmacológica), inconsciência, anestesia cirúrgica, coma e depressão respiratória e cardiovascular. Essas propriedades são compartilhadas por

agentes químicos como os barbitúricos, sedativos tradicionais, e mais atualmente, os benzodiazepínicos. Os barbitúricos deixaram de ser usados na prática psiquiátrica moderna, principalmente, por sua tendência de provocar sedação exagerada, intoxicação, tolerância e dependência física (HAFFNER, MORLAND, SETEKLEIV *et al.*, 1973; BALDESSARINI, 1996; RALL, 1996).

Outros agentes utilizados no manejo da ansiedade são os beta-bloqueadores adrenérgicos, sendo o propranolol o protótipo do grupo, os anti-histamínicos clássicos do tipo H₁, como a prometazina, por sua ação central, e o hidrato de cloral (BALDESSARINI, 1996; WANNMACHER e FERREIRA, 1999)

O papel da sedação diária para acalmar pacientes ansiosos, aliviando o estresse, atualmente é bastante restrito aos benzodiazepínicos, menos perigosos por sua incapacidade de deprimir o SNC. A introdução na clínica médica, em 1961, do clordiazepóxido inaugurou a era dos benzodiazepínicos, com cerca de 35 agentes estando em uso clínico em várias partes do mundo, pois além de suas propriedades sedativas, os benzodiazepínicos são eficazes no relaxamento muscular, o que contribui para o efeito tranqüilizador (HAFFNER, MORLAND, SETEKLEIV *et al.*, 1973; RALL, 1996).

Dentre os benzodiazepínicos, o diazepam é o medicamento mais prescrito para o tratamento da ansiedade e insônia em adultos, sendo ótima opção para pacientes pediátricos (HAFFNER, MORLAND, SETEKLEIV *et al.*, 1973; RAY, GRIFFIN e DOWNEY, 1989; BALDESSARINI, 1996; WANNMACHER e FERREIRA, 1999) (Quadro 1, página 72).

Quadro 1 Principais benzodiazepínicos de aplicação clínica

<i>Nome genérico</i>	<i>Exemplo de nome comercial</i>
Bromazepam	Lexotan
Clonazepam	Rivotril
Clorazepato	Tranxene
Clordiazepóxido	Librium
Diazepam	Valium
Flurazepam	Dalmane
Lorazepam	Lorax

A estrutura química dos benzodiazepínicos consiste de um anel benzeno fundido a um anel diazepínico de sete átomos e um anel 5-arílico, sendo possível várias modificações na estrutura dos sistemas de anéis, produzindo compostos com atividades semelhantes (RALL, 1996). Os efeitos dos benzodiazepínicos resultam da ação sobre o SNC, provocando sedação, hipnose, sensação de sono profundo e repousante (sem perda do estado de vigília), diminuição da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia para eventos subseqüentes à administração da droga, além da atividade anticonvulsivante (BALDESSARINI, 1996).

O sistema límbico recebe as informações sensoriais, analisa sua significância biológica, criando estados motivacionais que impulsionam comportamentos (BARNHILL, CIRAULO, GREENBLATT *et al.*, 1991; ANDRADE, 1999). O controle das reações somáticas e psíquicas aos estímulos geradores de estresse é mediado naturalmente pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor endógeno específico, que aumenta a

frequência dos momentos de abertura dos canais de cloro e ampliando sua condutância, promovendo a inibição neural desses estados. Os benzodiazepínicos exercem sua ação ansiolítica potencializando a ação do GABA. Outros supostos mecanismos de diminuição da excitabilidade neural produzida pelos benzodiazepínicos são o aumento da condutância do íon K^+ dependente do Ca^{2+} e do acúmulo de adenosina (BALDESSARINI, 1996).

Isto explica uma das razões para a grande margem de segurança clínica no emprego dos benzodiazepínicos, pois necessitam da expressão de uma substância produzida pelo próprio organismo para manifestação de seus efeitos terapêuticos. Tomando-se como exemplo o diazepam, sua dose tóxica em humanos (250-400mg) é extremamente maior que a dose terapêutica (5-10mg) (HAFFNER, MORLAND, SETEKLEIV *et al.*, 1973; WAN, XIA, HE *et al.*, 1996; ANDRADE, 1999).

Os vários benzodiazepínicos apresentam o mesmo mecanismo de ação, diferindo apenas em relação às propriedades farmacocinéticas (início e duração da ação ansiolítica). Todos os benzodiazepínicos são absorvidos de modo completo pela via oral ou administração intravenosa, sendo metabolizados pelos vários sistemas enzimáticos microssômicos no fígado, gerando metabólitos ativos, com altos coeficientes de lipofilidade, por outro lado, a administração intramuscular não é muito efetiva (HILLESTAD, HANSEN, MELSON *et al.*, 1974; DIVOLL, GREENBLATT, OCHS *et al.*, 1983; RALL, 1996).

Como droga ansiolítica, o diazepam é comumente prescrito para administração oral, via pela qual é rapidamente absorvido, atingindo concentrações máximas em cerca de 1 hora em adultos e até em 15 a 30

minutos em crianças. Os demais benzodiazepínicos apresentam absorção que varia de lenta à intermediária. Os benzodiazepínicos e seus metabólitos ativos ligam-se às proteínas plasmáticas (85 a 95%), ocorrendo rápida captação desses agentes no cérebro, e em seguida havendo redistribuição para outros tecidos como os músculos e a gordura que são menos perfundidos. (BALDESSARINI, 1996).

A administração oral contínua de diazepam, mesmo em doses sedativas, causa progressivo acúmulo da droga, principalmente durante a primeira semana de tratamento, período após o qual, o equilíbrio entre o acúmulo e a eliminação pela urina é atingido, sendo que o mesmo se aplica aos seus metabólitos, embora esses necessitem o dobro de tempo para serem eliminados (HILLESTAD, HANSEN, MELSON *et al.*, 1974).

Como os metabólitos ativos são mais lentamente processados que os compostos originais, a duração de ação de muitos benzodiazepínicos apresenta pouca relação com o tempo de meia-vida de eliminação da droga administrada. Por exemplo, a meia-vida plasmática do diazepam varia de 1 a 2 dias, mas pelo fato de ser uma droga de meia-vida longa, já foram descritas concentrações plasmáticas máximas secundárias de 6 a 12 horas após uma única dose oral. A meia-vida de seus metabólitos ativos pode ser maior do que 20 horas, como no caso do desmetildiazepam que chega a ser de 60 horas. Esses parâmetros farmacocinéticos podem modificar de forma acentuada a duração dos efeitos das drogas, muito embora em relação ao diazepam, os efeitos de seus metabólitos são de menor intensidade (BALDESSARINI, 1996; HERMAN e WILKINSON, 1996).

Os benzodiazepínicos, mesmo em menor nível do que outras drogas psicotrópicas, podem provocar tanto tolerância, como crises de abstinência com a interrupção abrupta do fármaco (RAY, GRIFFIN e DOWNWY, 1989; HERMAN e WILKINSON, 1996; STEVENINCK, WALLNÖFER, SCHOEMAKER *et al.*, 1997).

Embora sejam empregados primariamente na clínica como drogas sedativo-ansiolíticas, os benzodiazepínicos também são utilizados no tratamento das epilepsias. A visão atual é de que as ações anticonvulsivantes dos benzodiazepínicos, bem como outros efeitos que ocorrem com doses não-sedativas, resultam em grande parte de sua capacidade em ampliar os efeitos induzidos pelo neurotransmissor GABA, e pela sua capacidade de promover o acúmulo de adenosina, diminuindo assim a excitabilidade neuronal (RALL e SCHLEIFER, 1996).

Muito dos efeitos dos hormônios e substâncias neurotransmissoras no cérebro é mediado pelo sistema do AMPc, visto que este nucleotídeo e as enzimas adenil ciclase e fosfodiesterase são encontradas em grande abundância no SNC, mais do que em qualquer outro tecido (THOMPSON e APPLEMAN, 1971; BEER, CHASIN, CLODY *et al.*, 1972).

As drogas psicotrópicas também parecem afetar os níveis dos nucleotídeos cíclicos. Drogas como os benzodiazepínicos, as fenotiazinas, a reserpina inibem a ação da fosfodiesterase, a enzima responsável pela degradação do AMPc (RALL, 1996). Trabalhos anteriores mostraram aumento na concentração dos níveis de AMPc em pacientes tratados com drogas psicotrópicas, demonstrando que os efeitos obtidos por essas drogas no SNC é mediado por este nucleotídeo (BEER, CHASIN, CLODY *et al.*, 1972, RALL,

1996). O diazepam é potente inibidor das fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos, seja do AMPc ou do GMPc, em vários modelos animais experimentais, com ação comparável a dos inibidores mais ativos, como a papaverina, a dipiridamole, sobrepujando inclusive a ação da teofilina, um dos inibidores da fosfodiesterase mais usados em pesquisas científicas (CHEUNG, 1970; DALTON, CROWLEY, SHEPPARD *et al.*, 1974; YAMASAKI, 1983).

O tratamento com drogas de ação ansiolítica e anticonvulsivante em pacientes ambulatoriais (não apenas durante o estado epilético) pode afetar a ação de vários hormônios, como a inibição da secreção do hormônio antidiurético, da calcitonina, da insulina, do hormônio adrenocorticotrópico e do PTH. Um dos efeitos colaterais mais marcantes na terapia com essa classe de fármacos é a alteração do metabolismo do cálcio, que resulta na depleção do nível sérico, além de induzir a um quadro de osteomalacia ou raquitismo (HAHN, BIRGE, SCHARP *et al.*, 1972; PENTO, GLICK e KAGAN, 1973).

Acredita-se que essas drogas interfiram no metabolismo da vitamina D pelas enzimas hepáticas microsomiais, acelerando-o, além prejudicarem diretamente o metabolismo ósseo pela inibição da enzima fosfatase alcalina e pela diminuição da quantidade disponível de mineral para a formação óssea. Assim, devido à deficiência da vitamina D e pelo prejuízo à osteogênese, ocorre depleção dos níveis plasmáticos de cálcio e diminuição da massa óssea (RICHENS e ROWE, 1970; LIVINGSTON, BERMAN e PAULI, 1973). Sugere-se também que as drogas ansiolíticas e anticonvulsivantes possam exercer efeito duplo sobre o metabolismo do osso e do cálcio, afetando não apenas o

metabolismo da vitamina D, como também a ação do hormônio da paratireóide, indispensável para o remodelamento ósseo e para o desenvolvimento dentário. Esses efeitos dependem da dose e do tempo de uso desses medicamentos (ROBINSON, ROWE e HARRIS, 1978). A 1,25-dihidroxitamina D₃, embora não altere diretamente a os níveis de AMPc, afeta a proteína quinase AMPc-dependente. A ativação dessas proteínas quinase são responsáveis pelos efeitos conhecidos do AMPc nas células eucarióticas (AUBIN, 1989; STRYER, 1992).

Muitos estudos já indicaram que o controle da hidrólise do AMPc realizada pela fosfodiesterase é determinante na sua concentração celular, tornando-se importante mecanismo na regulação de várias atividades metabólicas das células. Os nucleotídeos cíclicos são funcionalmente ativos nas células inflamatórias, como macrófagos e leucócitos, sendo que os eventos celulares e moleculares envolvidos com o remodelamento ósseo associado ao tratamento ortodôntico têm estreita semelhança em muitos aspectos com o processo de inflamação e reparo (HAHN, HENDIN, SCHARP *et al.*, 1975; ROBINSON, ROWE e HARRIS, 1978; DAVIDOVITCH, FINKELSON, STEIGMAN *et al.*, 1980; YAMASAKI, 1983; BARDIN, DORWARD, LAMPE *et al.*, 1998; SODEK e McKEE, 2000).

Uma vez que fármacos ansiolíticos e anticonvulsivantes afetam o remodelamento ósseo, estes também poderiam afetar os procedimentos ortodônticos devido à alteração da reação tissular e, conseqüentemente, o movimento dentário (CHEUNG, 1970; KLEIN e RAISZ, 1971; THOMPSON e APPLEMAN, 1971; RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975; YAMASAKI, 1983; DAVIDOVITCH, FINKELSON, STEIGMAN *et al.*, 1980; SHANFELD,

JONES, LASTER *et al.*, 1986). Sendo assim, existe grande interesse no potencial uso de inibidores seletivos da fosfodiesterase dos nucleotídeos cíclicos devido à elevação nos níveis do AMPc estar intimamente associada aos eventos do remodelamento ósseo.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a influência do diazepam no movimento ortodôntico quanto:

3.1 à taxa de movimento dentário;

3.2 às alterações teciduais ocorridas no ligamento periodontal e osso alveolar adjacente à área de pressão e tração dos dentes submetidos à movimentação ortodôntica, através da ML e da MET;

3.3 ao aspecto ultraestrutural das superfícies radiculares distais dos incisivos superiores no lado de pressão, através da MEV.

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesta pesquisa foram utilizadas trinta e seis cobaias (*Cavia, porcellus*), adultas, pesando entre 400 a 450g, com idade aproximada de sessenta dias (Figura 1, página 81), cedidas pelo Biotério do Centro de Produção de Animais de Laboratório do Instituto Vital Brazil.

O método experimental *in vivo* aplicado obedeceu às recomendações e orientações éticas do CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (1984); às recomendações legais conforme Lei nº 6.638, de 08/05/79, publicada no Diário Oficial da União, e às de biossegurança (SILVA, 1998) especificadas para a experimentação animal. Animais machos foram usados, para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo feminino. O período de aclimação não foi necessário devido ao nascimento e ao experimento terem sido realizados no mesmo ambiente.



Figura 1 Fotografia do modelo animal utilizado na pesquisa.

4.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Para evitar mordeduras e brigas, as cobaias foram alojadas individualmente em gaiolas (CECAL, 1998). A gaiola-viveiro era constituída por caixa de propileno semi-fosco, com locais específicos para colocação de alimento e água. Durante todo o experimento, as gaiolas permaneceram forradas com raspas de madeira (maravalha de pinus), com a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada no seu interior, mantendo o fundo sempre seco, e servindo também como isolante térmico, a fim de reduzir a condução de calor do corpo dos animais.

A maravalha era substituída diariamente por novas porções, para evitar o acúmulo de gases tóxicos (amônia e sulfeto de hidrogênio) resultantes da degradação oxidativa e bacteriana dos excrementos,

oferecendo assim, condições favoráveis de higiene, conforto e bem estar (BAKER, LINDSEY e WEISBROTH, 1979).

Foram utilizados dispensadores de vidro para água, com bico de aço inoxidável, com capacidade para 500ml (Elo's), disponíveis permanentemente na gaiola para garantir suprimento constante de água mineral aos animais (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984). Pela incapacidade das cobaias em sintetizar ácido ascórbico foi realizada a adição 20mg de vitamina C à água mineral dos dispensadores de vidro, sendo que a solução era preparada diariamente, pelo fato do ácido ascórbico ser termo-lábil, com perda de 50% de seu valor no período de 24 horas (KRÁMER, FILLIOS e BOWLER, 1979; JOHNSTON e HUANG, 1991). Com esta suplementação vitamínica, evitou-se o aparecimento de sinais e sintomas característicos da deficiência da vitamina C, que correspondem à redução no consumo de ração e perda de peso, seguida por anemia e hemorragia generalizada, podendo levar à morte em 3 a 4 semanas ou infecções secundárias (HUNT e PAYNTER, 1959; LITTON, 1974; OGAWARA, AOKI, OKIJI *et al.*, 1997).

Os animais foram alimentados com ração comercial apropriada, peletizada (Nuvilab Cobaias, Nuvital Nutrientes) com 4mm de diâmetro e 6mm de comprimento, sendo que o consumo médio diário foi de 40g. Com a finalidade de evitar formação e proliferação de fungos, por exposição prolongada do alimento, efetuou-se troca diária da ração. O uso de substâncias desodorizantes ou desinfetantes foi evitado, para não causar qualquer interferência no experimento (BAKER, LINDSEY e

WEISBROTH, 1979).

A temperatura ambiente manteve-se entre 16° e 20°C, ideal para o crescimento das cobaias (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984). Foi feito controle de fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico (YAMAUCHI, FUJITA, OBARA *et al.*, 1981). Com o objetivo de observar alterações de peso e para o cálculo e ajustes das dosagens da medicação a ser administrada, as cobaias foram pesadas no início da pesquisa e diariamente, até a sua conclusão com auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001).

4.2 AMOSTRA

Os animais foram escolhidos e divididos aleatoriamente em três grupos:

a) **controle**, constituído de quatro animais que não foram submetidos a qualquer tipo de procedimento clínico;

b) **placebo**, com dezesseis animais submetidos à movimentação dentária e à administração de 0,5ml/kg de solução salina a 0,9%, de 12 em 12 horas, e

c) **experimental**, também composto de dezesseis animais submetidos aos mesmos procedimentos do grupo anterior, apenas substituindo a água pela administração de 2,5mg/kg de diazepam, a cada 12 horas.

O experimento teve duração de 14 dias, porém de acordo com o grupo ao qual cada animal pertencia, houve diferentes dias de sacrifício conforme Quadro 2 abaixo.

Quadro 2 Quantidade de animais utilizados por grupo, aplicação do medicamento e tempo de sacrifício.

<i>Dias de sacrifício</i>	CONTROLE	PLACEBO	EXPERIMENTAL
0	4		
3		4	4
7		4	4
14		8	8
Medicação	isento	solução salina	diazepam

4.3 DOSAGEM E APLICAÇÃO DA MEDICAÇÃO

A dosagem de 2,5mg/kg de diazepam a cada 12 horas produziu efeito tranqüilizante nas cobaias (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984) (Figura 2, página 85). A apresentação comercial do medicamento doado pelo Laboratório do Instituto Vital Brazil foi na forma de ampolas de 5mg/ml. Tanto a solução salina, como o diazepam foram administrados por via intra-peritoneal, sendo que a primeira administração foi feita 1 hora antes da ativação dos dispositivos ortodônticos (SCHWARTZ, KOECHLIN, POSTMA *et al.*, 1965; YAMASAKI, 1983).



Figura 2 Fotografia de um animal do grupo **experimental** sob efeito do diazepam.

4.4 ANESTESIA E SEDAÇÃO

A administração de cloridrato de ketamina (Francotar) por via intramuscular foi realizada nos seguintes momentos:

a) antes das tomadas radiográficas e dos registros da movimentação dentária aferidos no decorrer do experimento, na concentração de 15mg/Kg, como tranquilizante, por curto período de tempo, o suficiente para se obter a imobilização necessária para tais procedimentos, e

b) antes dos procedimentos de posicionamento e colagem dos dispositivos na concentração de 22mg/kg, com finalidade anestésica (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984; MASSONE, 1988).

4.5 CONFEÇÃO DO DISPOSITIVO ORTODÔNTICO

O dispositivo ortodôntico intra-oral, desenhado com o objetivo de promover separação dos incisivos superiores das cobaias, foi confeccionado com fio de liga titânio-molibdênio (TMA, Ormco Corp.) de secção circular e de diâmetro 0.016" (Figura 3, página 87), no qual foi incorporado mola helicoidal com 4 voltas de 2mm de diâmetro e hastes de 15mm de comprimento (BOTTING e STOREY, 1973; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996) (Figura 4 B, página 87).

Uma dobra vertical foi realizada em uma das hastes a 1mm à frente da mola, para permitir que ambas ficassem no mesmo plano e, em cada extremidade da haste foi feita uma dobra horizontal com 1,5mm de extensão. Em direção à face palatina, foi confeccionada nova dobra com 1mm de extensão para auxiliar na estabilização vertical do dispositivo (Figura 4 B, página 87).

A força inicial exercida pelo dispositivo ortodôntico foi determinada antes da inserção, com auxílio de dinamômetro (Dentaurum 040-711). Com as faces mesiais das hastes do dispositivo ortodôntico se tocando, a mola foi capaz de exercer força recíproca lateral de 25g. O uso do paquímetro digital de precisão (MCA) permitiu a padronização em 18 mm da separação entre as hastes, a partir de suas extremidades (Figura 4 A, página 87).

O posicionamento do dispositivo permitiu que a mola, quando acionada, promovesse tração no ligamento periodontal do lado mesial e compressão no lado distal.

Todos os dispositivos foram confeccionados pelo mesmo operador, sendo utilizados alicates do tipo “*bird-beak*” (Orthopli: nº 0.30) e *Tweed* (Orthopli: nº 0.60).

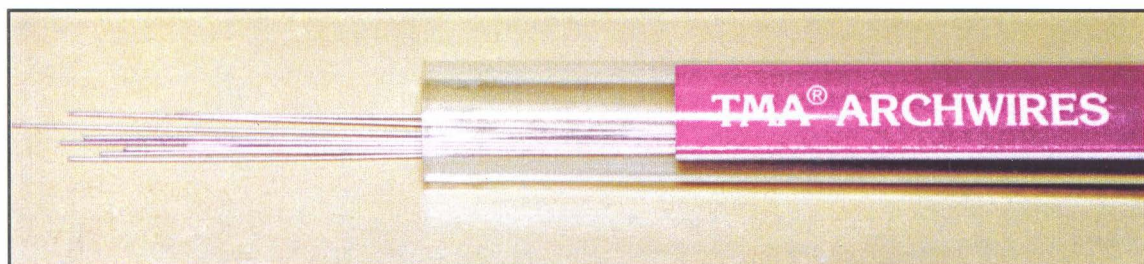


Figura 3 Fotografia da embalagem comercial da liga de titânio-molibdênio utilizada na confecção do dispositivo ortodôntico.

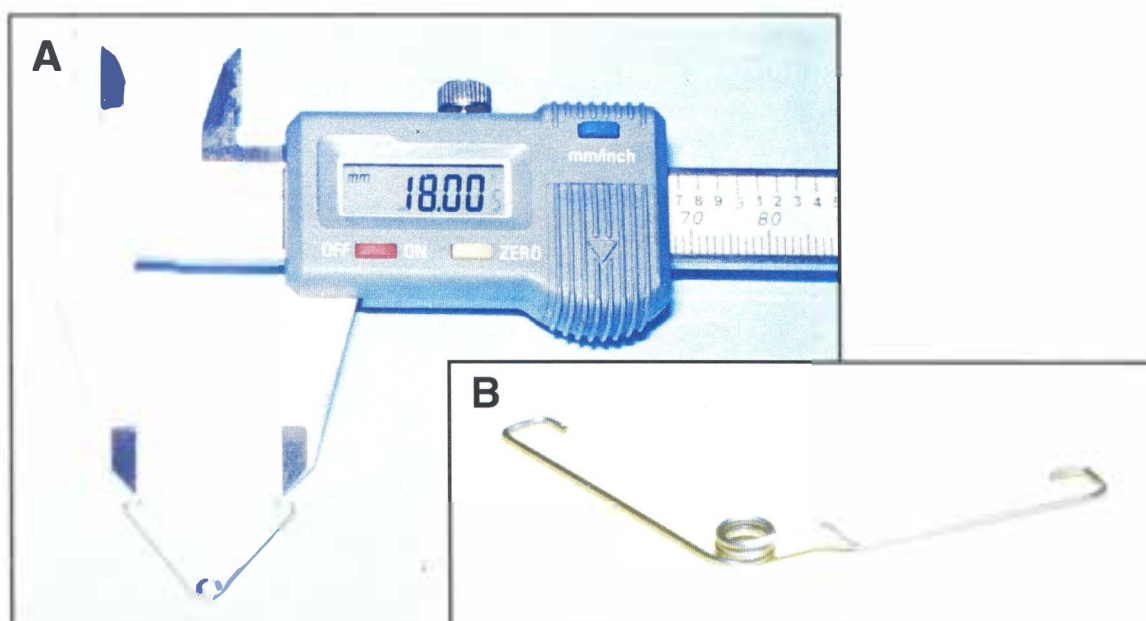


Figura 4 Ilustrações fotográficas do dispositivo ortodôntico após confecção:
A) padronização da abertura entre as hastes em 18mm, com auxílio do paquímetro digital de precisão;
B) mola helicoidal e dobras realizadas em detalhe.

4.6 PREPARO DOS DENTES E COLAGEM DO DISPOSITIVO

O preparo dos incisivos superiores (Figura 5 B e C, página 90) consistiu na confecção de sulcos interproximais (nas faces mesiais) com broca

adiamantada esférica de 1/2mm de diâmetro (Intensiv) (Figura 5 B, página 90). Com broca adiamantada cilíndrica (nº 1090, KG Sorensen) foram feitas canaletas nas faces vestibulares, perpendiculares aos sulcos interproximais, na altura do vértice da papila gengival interdentária (Figura 5 C, página 90). Para sua utilização, as brocas foram adaptadas em caneta de alta rotação (Kavo). A função das canaletas era permitir a estabilização do dispositivo durante o procedimento de colagem e resistência ao deslocamento ocluso-gengival.

Para prevenir interferências oclusais com o dispositivo, as bordas dos incisivos inferiores foram reduzidas utilizando-se broca adiamantada cilíndrica (KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). Suave bisel foi realizado na superfície vestibular dos incisivos superiores, com broca adiamantada cônica plana (nº 3070, KG Sorensen), a fim de aumentar a adesão da resina composta (Figura 5 D, página 90).

Após a profilaxia do esmalte dentário, realizada com pedra-pomes ultrafina misturada com água e taça de borracha (Viking) adaptada em contra-ângulo (Kavo), a superfície foi lavada e seca, mantendo-se o isolamento relativo do campo operatório com rolos de algodão (Franso). O esmalte foi condicionado com ácido orto-fosfórico a 37% em gel (Email Gel Blue-S, Vivadent) por 15 segundos, em seguida a superfície foi lavada com água por 15 segundos e seca (Figura 5 E, página 90). O agente de união (Prime e Bond 2.0 – Dentsply) foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho Ortholux XT (3M – Unitek).

As dobras mesiais foram aproximadas até que se tocassem. Um segmento de fio dental foi amarrado na altura da metade das hastes do dispositivo, até que este fosse ativado. Pinça Mathieu (HSD – nº 005-14, Hammacher) foi utilizada para facilitar posicionamento e colagem do dispositivo (Figura 5 F, página 90). A mola helicoidal foi posicionada cerca de 1mm distante do palato para evitar ulceração da mucosa palatina. As dobras mesiais foram adaptadas nos sulcos interproximais. Procedeu-se então, a colagem do dispositivo à superfície vestibular dos incisivos com resina fotopolimerizável Z 100 (3M), utilizando-se o aparelho Ortholux XT por 40 segundos (Figura 5 G, página 90) Várias camadas de resina foram colocadas e fotopolimerizadas, para compensar o desgaste decorrente do contínuo hábito roedor das cobaias (Figura 5 H, página 90). Antes da colocação do dispositivo ortodôntico, a maxila de cada animal dos grupos **placebo** e **experimental** foi radiografada em filme intra-oral periapical Ektaspeed Plus (Kodak), tempo de exposição de 0,4 segundo, com aparelho de raios X (Funk Rx 10, 110 volts, 60 Kv, 10 mA) posicionado perpendicularmente à película, para verificar a continuidade da sutura inter-pré-maxilar (KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). Este procedimento foi repetido antes do sacrifício de cada animal. As películas foram processadas pelo método visual à temperatura de 24°C, com lavagem intermediária em água corrente por 20 segundos, fixação por 10 minutos e lavagem final durante 20 minutos (FREITAS, 1992).

O fio dental que mantinha as hastes do dispositivo unidas foi cortado com tesoura reta (HSB 648-10, Hammacher) 1 hora após a administração de diazepam (grupo **experimental**) e da solução salina (grupo **placebo**).

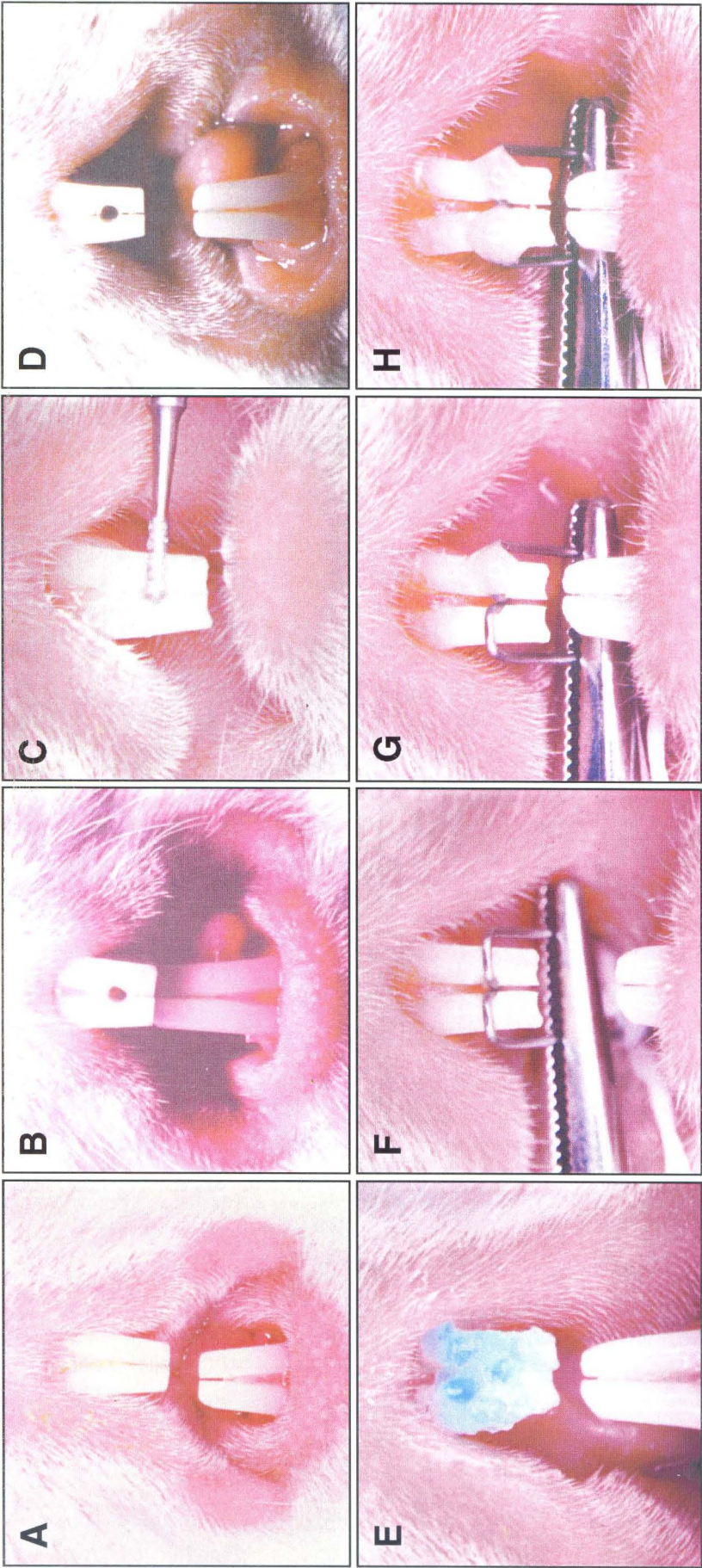


Figura 5 Sequência fotográfica da montagem do dispositivo ortodôntico: **A)** vista frontal dos incisivos da cobaia; **B)** sulcos interproximais confeccionados nas faces mesiais dos incisivos superiores; **C)** realização de canaleta na face vestibular dos incisivos, perpendicular a cada sulco, interproximal com o auxílio de broca adiamantada cilíndrica; **D)** preparo finalizado; **E)** condicionamento ácido; **F)** dispositivo posicionado com auxílio de pinça Mathieu; **G)** colagem com resina fotopolimerizável no incisivo superior esquerdo; **H)** finalização da colagem.

4.7 CONTROLE CLÍNICO DA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA

Antes da colocação dos dispositivos, nenhum espaço mensurável havia entre os incisivos superiores (Figura 5 A, página 90). Após a colagem, mensurações lineares diretas da distância entre os incisivos foram realizadas no 3º, 7º e 14º dia do experimento (MORIMOTO, YAMAGUCHI e TANNE, 1999), utilizando-se paquímetro digital de precisão, tendo como referência a face interna da extremidade da haste posicionada no sulco interproximal.

4.8 SACRIFÍCIO E PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS

No 3º, 7º e 14º dia do experimento os animais foram sacrificados por asfixia com éter etílico puro (Veter), numa campânula de vidro hermeticamente fechada (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984). Em seguida, os animais foram decapitados, sendo realizada a dissecação e osteotomia da pré-maxila.

Para a dissecação foi feita incisão no tecido mucoso oral com bisturi nº 3, ao qual se adaptou lâmina nº 11 (BD), expondo o tecido ósseo. A área para a osteotomia foi demarcada através de orifícios sucessivos, com orientação retilínea, feitos com broca esférica carbide (nº H1314021, Komet) montada em micromotor de baixa rotação (Kavo), sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico para não causar o aquecimento da peça. Os orifícios foram unidos e aprofundados até o ponto de se conseguir a secção do tecido ósseo. Quando

necessário, completou-se a separação das estruturas profundas com cinzel. As peças, ao final destes procedimentos, foram devidamente identificadas e imersas em solução fixadora.

4.9 PREPARO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os espécimens foram estudados através de microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As substâncias utilizadas para a fixação e descalcificação das peças variaram conforme sua finalidade. As peças destinadas à ML foram fixadas em solução de formol neutro a 10% (Reagen) durante uma semana e submetidas ao processo de descalcificação em solução de EDTA (Isofar) a 14% (MORIMOTO, YAMAGUCHI e TANNE, 1999).

As peças destinadas à MET foram armazenadas em solução fixadora contendo paraformaldeído (Isofar) a 4%, glutaraldeído (Bayer) a 2,5%, CaCl_2 (Bayer) a 5mM, tamponada com cacodilato (Bayer) a 0,1M (solução de Karnovsky) a temperatura de 10°C (KARNOVSKY, 1965), por três semanas e descalcificadas em solução de EDTA (Isofar) a 10% (KAMAKURA, SASANO, HOMMA-OHKI *et al.*, 1997; KIM, YOSHIDA, YOKOYA *et al.*, 1999).

Durante a descalcificação, as peças foram armazenadas individualmente, em frascos esterilizados, contendo quantidade de solução descalcificadora correspondente a 20 vezes o seu volume,

renovada a cada 72 horas. A confirmação da completa remoção dos sais minerais foi realizada através do teste de punção com agulha (BD) no tecido duro, considerando-se completa, quando as peças não oferecessem resistência à penetração nas estruturas óssea e dentária. Uma vez alcançado o ponto ideal de descalcificação, as peças foram seccionadas no plano frontal na altura do forame incisivo, obtendo-se cortes transversais (Figura 6).

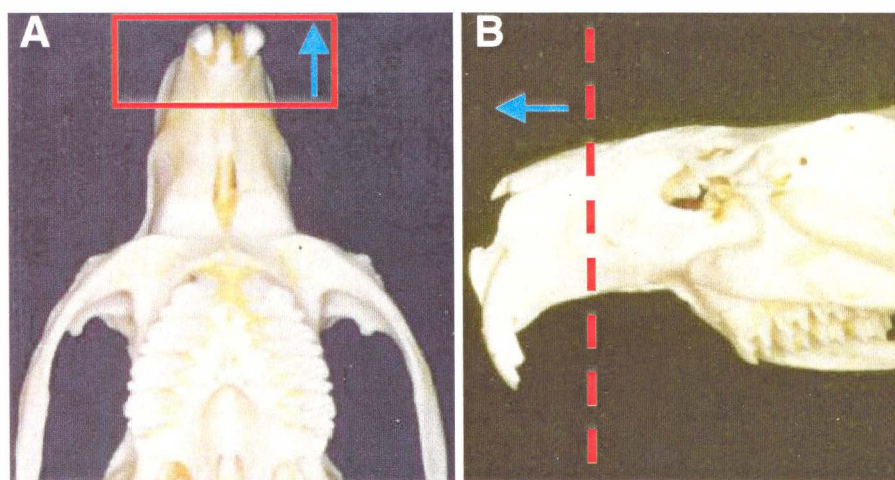


Figura 6 Ilustração fotográfica dos planos de secção das cabeças das cobaias:
A) vista oclusal destacando a porção da pré-maxila destinada à descalcificação (□) e direção dos cortes histológicos (↑);
B) vista lateral da localização da secção (←).

O preparo das peças segmentadas para ML foi feito no Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. Seguindo os procedimentos descritos por MICHALANY (1998), a técnica histológica envolveu, a partir dos tecidos fixados, a lavagem das peças em água corrente durante 24 horas para remoção da solução ácida na qual estiveram imersas. Em seguida, procedeu-se a

desidratação através de porcentagens crescentes e sucessivas de soluções de álcool a 70%, 80%, 90% e 100% (Reagen), por 30 minutos em cada concentração, para evitar trocas osmóticas bruscas. Concluída a desidratação, as peças foram submetidas a três banhos de xilol (Merck), miscível tanto em álcool como em parafina, removendo todo o álcool e tornando o tecido em condições de ser impregnado pela parafina. Após a substituição completa do álcool pelo xilol, as peças foram submersas em parafina fundida (Reagen) e levadas a uma estufa de temperatura constante regulada para 58°C, durante várias horas, até que o xilol fosse substituído pela parafina. Completada a infiltração, as peças foram posicionadas no centro de uma pequena caixa de papel com dimensões aproximadas de 30mm de extensão por 15mm de largura e profundidade. Antes da solidificação, o fragmento foi orientado em relação à face anterior paralela ao sentido dos cortes desejados. Deste modo, os cortes mais superficiais foram obtidos da superfície da peça voltada em direção paralela ao fundo da caixa de inclusão, oposta à face vestibular das coroas dos incisivos. Os blocos de parafina solidificados foram identificados e colocados em água gelada e depois levados ao refrigerador para evitar sua cristalização. Estes foram removidos da caixa de papel e aparados com navalhas adequadas, até que permanecessem 5mm de parafina em cada um dos quatro lados, de tal maneira que os mesmos ficassem paralelos.

Cortes seriados, com espessura aproximada de 6µm, foram feitos com micrótomo rotativo de precisão (Spencer, modelo 820). As fitas de interesse foram levadas ao cristalizador, sendo distendidas e

montadas em lâminas para microscopia (Invicta). As lâminas foram colocadas em posição vertical para escorrer, e posteriormente, levadas a uma estufa regulada entre 46° e 50°C por 24 horas. Algodão embebido em formol, cujos vapores insolubilizam a gelatina e previnem a poluição microbiana, foi colocado na estufa para evitar contaminação dos cortes por bactérias.

Para que o corte pudesse entrar em contato com a solução corante, foi feita a desparafinização. Para isso, procedeu-se primeiro à eliminação da parafina dos cortes pelo xilol, e em seguida, à alcoolização através de porcentagens decrescentes de soluções de álcool etílico absoluto (Reagen) a 90%, 70% e 40%, destinadas a eliminar o solvente e, finalmente, à hidratação, substituindo o álcool pela água destilada. Esse procedimento teve como finalidade evitar fenômenos osmóticos bruscos, os quais motivariam retrações e deslocamento do material. Os cortes hidratados foram submetidos à coloração por hematoxilina por 10 minutos. Procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente até assumirem tom azulado, sendo então, mergulhadas rapidamente em solução de ácido clorídrico a 1%, diluído em álcool a 70%. Nova lavagem foi realizada em água corrente por 5 a 10 minutos e álcool a 95%. A eosina foi aplicada (Merck) de 1 a 2 minutos, conferindo aos tecidos a coloração rosada. Foi feita nova desidratação através de porcentagens crescentes de álcool, até chegar ao álcool absoluto, quando as lâminas foram submetidas a três banhos de xilol (diafanização), após o que as lamínulas foram limpas com álcool e dispostas numa folha de papel sobre uma mesa, para que se

realizasse a deposição de uma ou mais gotas de bálsamo do Canadá natural diluído (Reagen). Em seguida, o corte foi colocado com a lâmina invertida sobre a lamínula, fazendo delicada pressão com agulha apropriada de histologia. As bolhas de ar, que porventura ficaram retidas, desapareceram depois de algumas horas (MICHALANY, 1998).

Terminada a montagem, fez-se a rotulagem, onde os cortes foram identificados, estando prontos para análise no microscópio de luz. A leitura das estruturas histológicas foi realizada com o auxílio do microscópio HM-LUX (Wild Leitz Periplan), com resoluções de 10 NF x 3.2 para visualização panorâmica do preparo histológico, 10 NF x 20 para individualização e identificação morfológica dos tecidos do periodonto de sustentação e 10 NF x 40 para identificação das células e demais estruturas. As áreas de interesse foram fotomicrografadas com filme (Kodacolor 100, Kodak) em microscópio de luz apropriado (Axioplan, Zeiss).

As peças destinadas à MET e à MEV foram manipuladas no laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto de Biofísica do Centro de Ciências da Saúde da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

A técnica histológica para MET envolveu, a partir de um dos segmentos osteotomizados, a dissecação da peça anatômica com o auxílio do microscópio de inversão (Nikon), em placa de Petri contendo solução Karnovsky, para obtenção de um bloco de aproximadamente 1mm³ da região correspondente à interface entre ligamento periodontal-osso alveolar e ligamento periodontal-dente das superfícies mesial e distal dos incisivos de um animal de cada grupo, conforme os dias de sacrifício. Devidamente identificados, os fragmentos foram transferidos para pequenos tubos de vidro individuais (Hexágonos), para 4

lavagens em tampão cacodilato a 0,1M (pH 7,2). Cada lavagem durou dez minutos. Em seguida, estes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, tamponado com cacodilato a 0,1M (pH 7,2) durante 30 minutos, tomando-se o cuidado de envolver todos os tubos de vidro em papel alumínio (Alumilar) para protegê-los da luminosidade. Completado o período, o OsO_4 foi removido e os fragmentos foram novamente lavados por 4 vezes em tampão cacodilato a 0,1M (pH 7,2), durante 10 minutos cada lavagem. Procedeu-se a desidratação do material através de concentrações crescentes de soluções de acetona (Reagen) a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, permanecendo o material durante 15 minutos em cada uma delas.

Os fragmentos desidratados foram colocados em solução de Epon diluído em acetona na proporção de 1:1 por 12 horas, mantendo-se todos os tubos hermeticamente fechados. Em seguida, foram realizadas 2 trocas da solução por Epon puro, previamente descongelado por 30 minutos, deixando-se os tubos abertos para permitir a saída de qualquer remanescente de acetona ainda presente no material. Foi feita outra troca e as peças foram colocadas em novo Epon, onde permaneceram por mais 4 horas, mantendo-se os tubos também abertos. .

Com o auxílio de palito de madeira (Imperial), os fragmentos foram retirados dos tubos e posicionados individualmente em cavidades de base de borracha preenchidas com Epon, numeradas, identificadas e orientadas de modo a permitir secção transversal das estruturas. Esse conjunto foi, então, polimerizado por 48 horas em estufa (Biomatic) sob temperatura constante regulada em 60°C. Após este período, a base foi retirada da estufa e os blocos

de resina foram removidos. Para se obter espessura mínima de resina em cada um dos lados da peça, os blocos foram acabados com uma lima de ferro.

A próxima etapa consistiu na confecção de uma pirâmide na extremidade dos blocos com piramitome (Ultramicrotomy System, LKB Produkter), de modo que o topo da mesma coincidissem com a região de maior interesse. Os blocos foram levados ao ultramicrotomo (Super Nova, Reichert-Jung) para realização de cortes com espessura em torno de 70nm, e os de coloração acinzentada foram selecionados no espelho d'água e transferidos para grades de cobre de malha 200 (Ted Pella). As grades foram colocadas sobre papel de filtro tipo 10 (Inlab) para secagem, sendo contrastadas por 30 minutos com acetato de uranila a 5%. Para proteger da luminosidade, as grades foram recobertas com filme de plástico (Parafilm M, American National Can). Em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas em citrato de chumbo por 5 minutos.

Procedeu-se nova lavagem em água destilada, sendo as grades colocadas em papel de filtro, estando os cortes finalmente prontos para serem examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (CEM 902, Zeiss), onde foram avaliados e eletromicrografados com filme Kodak Eletron Image Film SO 163 (Sigma).

Os filmes foram revelados em câmara escura, por 5 minutos, utilizando-se, para cada unidade, 15,5ml de revelador (HC 110 Developer, Kodak), diluídos em 484,5ml de água destilada. Em seguida, foram lavados 2 vezes em água destilada e mergulhados por 15 minutos no fixador (Kodak), sendo, então colocados em água corrente por 30

minutos para a lavagem final. Os filmes foram deixados à temperatura ambiente para secar.

As cópias foram feitas em papel fotográfico brilhante (Kodabrome Print RC, Kodak), sensibilizado com ampliador (Repro Durst Laborator 54, Durst) durante 4 segundos. Procedeu-se a revelação por 1 minuto, e lavagem por 2 vezes em água destilada e fixação por 10 minutos. As cópias foram colocadas em água corrente por 30 minutos para lavagem final e deixadas à temperatura ambiente para secar.

O preparo das peças para MEV foi realizado conforme preconizado por NG e colaboradores (1990). Após as osteotomias, as pré-maxilas foram fixadas em formol neutro a 10% (Reagen) pelo período de 48 horas, e em seguida, embebidas em solução de hipoclorito de sódio a 5,25% em temperatura ambiente até que os incisivos pudessem ser removidos com facilidade. Este procedimento permitiu a completa remoção dos fragmentos do ligamento periodontal aderidos às raízes dentárias, permitindo assim, observação e registro fotográfico da topografia radicular.

Os incisivos intactos foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de acetona (Reagen) de 75%, 95% e 100%. Os espécimens secos foram montados individualmente, de modo adequado em suportes porta-amostras ("stubs"), utilizando-se como adesivo cola de prata em pasta (Silver Conductive Adhesive, Eletron Microscopy Sciences). As raízes foram orientadas com a superfície distal para cima. As peças foram levadas ao evaporador convencional de alto vácuo (FL 9496, Balzers Union), sendo

revestidas com fina camada de ouro de aproximadamente 20 a 30nm de espessura, depositada sobre as reentrâncias e proeminências, provendo e aumentando a condutividade da superfície das amostras (HADDAD, SESSO, ATTIAS *et al.*, 1998).

A visualização da superfície topográfica das raízes foi realizada com microscópio eletrônico de varredura (JSM 840-A, Jeol), onde também foram feitas as eletromicrografias com filme Neopan SS, ISO 120 (Fuji Photo Film Co.). Os filmes foram revelados e copiados em papel brilhante (Kodacrome Print RC, Kodak), conforme descrito anteriormente.

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os valores lineares obtidos dos registros da separação dentária foram submetidos à análise descritiva e a testes não-paramétricos. Níveis de significância (*p-valor*) menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Para a análise estatística, os seguintes testes foram realizados:

a) testes de *Mann-Whitney* para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao peso e à taxa de separação dentária;

b) coeficientes de correlação de *Spearman* (*r*) para determinar se as mudanças que ocorreram no peso interferiram na movimentação dentária nos grupos **placebo** e **experimental**, e

c) teste de *Wilcoxon* para determinar se houve diferença entre o peso e a quantidade de movimentação dentária em cada grupo.

5 RESULTADO

5.1 ACHADOS RADIOGRÁFICOS

O exame radiográfico da região pré-maxilar antes da colocação do dispositivo e imediatamente antes de cada sacrifício dos animais dos grupos **placebo** e **experimental**, revelou que a sutura inter pré-maxilar manteve-se íntegra, não havendo separação ortopédica da mesma.

5.2 ACHADOS CLÍNICOS

5.2.1 PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Entre grupos **placebo** e **experimental** não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao peso dos animais aferido do primeiro ao último dia do experimento pela aplicação do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos na Tabela 1, página 103 e Tabela 2, página, 104.

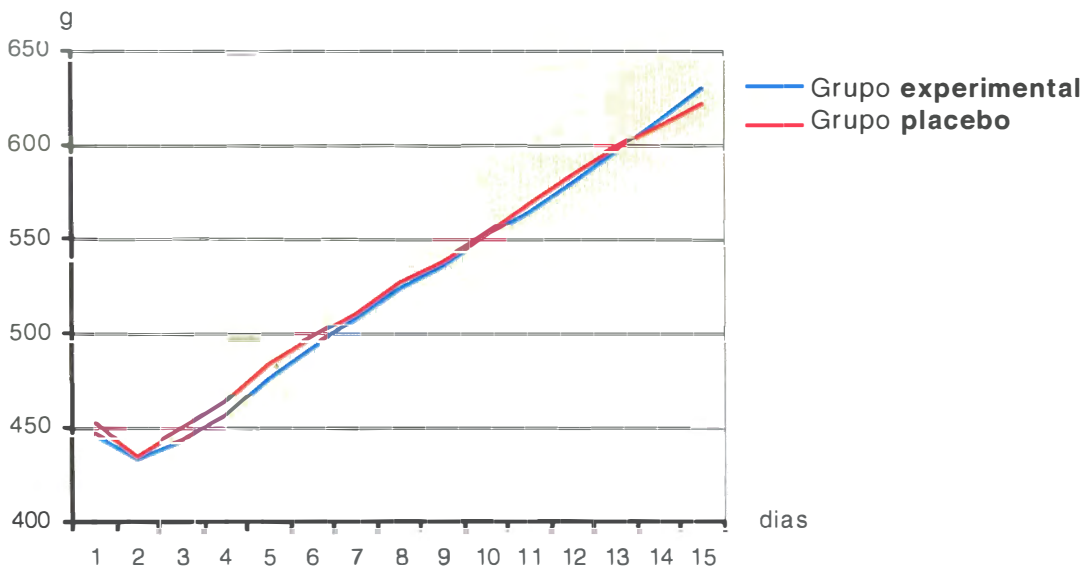
Tabela 1 Valores, média e desvio padrão do peso em gramas (g) durante o período do experimento para cada animal.

GRUPO		Peso (g) nos dias de observação														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
placebo																
1	450	435	431	452												
2	432	419	425	434												
3	444	421	436	448												
4	452	437	444	460												
5	433	420	436	448	468		485	500	516							
6	406	396	402	417	435		450	463	481							
7	487	478	486	493	505		522	530	545							
8	500	492	503	520	535		550	568	585							
9	499	485	501	509	521		530	550	571	581	596	610	630	648	655	660
10	442	430	440	455	471		486	500	516	536	550	577	595	608	619	635
11	490	419	496	510	524		541	560	576	589	599	613	624	637	642	651
12	402	388	410	419	431		446	454	471	491	510	527	540	557	570	582
13	447	430	450	468	483		500	512	524	533	549	565	580	596	602	616
14	440	431	439	450	465		474	483	500	508	527	539	550	567	589	601
15	428	419	430	440	459		472	488	503	515	524	542	558	570	586	599
16	480	467	476	490	506		514	525	540	555	569	584	600	612	625	638
Média	452,00	435,44	450,31	463,31	483,58		497,50	511,08	527,33	538,50	553,00	569,63	584,63	599,38	611,00	622,75
Desvio-padrão	30,83	30,12	32,08	32,11	34,53		34,36	36,73	36,93	34,65	32,98	32,32	33,54	33,23	29,35	27,55
experimental																
1	420	405	419	436												
2	405	392	400	412												
3	460	441	455	471												
4	427	415	426	438												
5	490	477	480	490	502		520	537	552							
6	469	460	470	479	482		500	516	532							
7	402	380	395	408	428		444	462	471							
8	470	465	471	482	500		519	539	558							
9	458	444	450	462	480		496	501	520	536	550	562	580	597	612	632
10	423	415	421	431	444		460	477	491	503	515	530	546	562	577	601
11	410	400	408	419	431		445	470	488	500	519	536	550	564	580	599
12	439	425	433	442	452		467	487	500	514	532	550	568	581	602	617
13	441	429	440	457	472		490	505	518	538	554	571	586	601	616	633
14	477	462	472	485	500		518	536	555	573	590	602	620	634	650	667
15	463	452	460	471	489		502	515	530	541	558	562	577	601	620	635
16	497	483	491	512	535		550	560	576	588	600	609	621	638	650	664
Média	446,94	434,06	443,19	455,94	476,25		492,58	508,75	524,25	536,63	552,25	565,25	581,00	597,25	613,38	631,00
Desvio-padrão	30,30	31,25	29,83	30,53	32,30		32,88	30,77	32,37	31,55	30,82	28,41	28,08	28,41	27,52	25,43

Tabela 2 Teste de *Mann-Whitney* para comparação das médias de peso entre os grupos **placebo** e **experimental** para cada dia do experimento

<i>Dia</i>	<i>Z</i>	<i>P-valor</i>
0	-0,528	0,598
1	-0,226	0,821
2	-0,603	0,546
3	-0,528	0,598
4	-0,578	0,563
5	-0,404	0,686
6	-0,029	0,977
7	-0,087	0,931
8	-0,053	0,958
9	-0,158	0,875
10	-0,525	0,599
11	-0,421	0,674
12	-0,210	0,834
13	-0,053	0,958
14	-0,474	0,636

Gráfico 1 Comparação do peso médio em gramas (g) durante o período do experimento, entre os grupos **placebo** e **experimental**.



Na análise comparativa de cada grupo observou-se um dia após a colocação e ativação do dispositivo ortodôntico, perda de peso

estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme resultados obtidos com a aplicação do teste de *Wilcoxon* (Tabela 3, página 105). Ganhos sucessivos de peso, entretanto, foram observados nos grupos **placebo** e **experimental** nos demais dias de aferição. No 3º dia, o peso médio dos animais de ambos os grupos superou ao aferido no dia 0 (Gráfico 1, página 104).

Tabela 3 Teste de *Wilcoxon* para comparação das médias de peso em gramas (g) e diferença do peso aferido (M) a cada dia, para os grupos **placebo** e **experimental**.

<i>Dia</i>	<i>Z</i>	<i>P-valor</i>	<i>Diferença (M)</i>
placebo			
0/1	-3,520	0,000	-12,87
1/2	-3,532	0,000	9,12
2/3	-3,523	0,000	12,75
3/4	-3,066	0,002	14,75
4/5	-3,077	0,002	16,33
5/6	-3,063	0,002	16,16
6/7	-3,068	0,002	15,50
7/8	-2,533	0,011	14,37
8/9	-2,527	0,012	15,62
9/10	-2,527	0,012	13,00
10/11	-2,536	0,011	15,75
11/12	-2,527	0,012	16,25
12/13	-2,536	0,011	16,12
13/14	-2,527	0,012	17,62
experimental			
0/1	-3,520	0,000	-16,56
1/2	-3,532	0,001	14,87
2/3	-3,523	0,000	13,00
3/4	-3,066	0,002	15,33
4/5	-3,077	0,002	13,91
5/6	-3,063	0,002	13,58
6/7	-3,068	0,002	16,25
7/8	-2,533	0,012	13,37
8/9	-2,527	0,012	14,50
9/10	-2,527	0,012	16,62
10/11	-2,536	0,012	15,00
11/12	-2,527	0,011	14,75
12/13	-2,536	0,012	11,62
13/14	-2,527	0,012	11,75

5.2.2 SEPARAÇÃO DENTÁRIA

As mudanças na separação dentária em cada grupo foram avaliadas através do teste de *Wilcoxon*. Ocorreram incrementos estatisticamente significantes a cada dia de registro da separação média entre os incisivos superiores das cobaias (Tabela 4, página 107 e Tabela 5, página 108).

A aplicação do teste de *Mann-Whitney* revelou elevada diferença estatística em relação às médias de separação dentária entre grupos testados (Tabela 6, página 108). No 3º dia, o grupo **experimental** apresentou considerável quantidade de separação dentária ($2,38 \pm 0,12$ mm) quando comparado ao grupo **placebo** ($1,28 \pm 0,11$ mm).

A diferença entre as médias de separação dentária aumentou gradualmente até o término do experimento. No 14º dia, o grupo **experimental** apresentou 2,31 mm a mais de separação dentária do que o grupo **placebo**, representando aumento no movimento dentário de 70% (Gráficos 2 e 3, página 109).

Coeficientes de correlação de *Spearman* foram calculados para verificar se ocorreu associação positivamente significante entre peso e separação dentária. Todas as correlações foram negativas para ambos os grupos, revelando que diferenças no peso dos animais não exerceram influência na taxa do movimento dentário (Tabela 7, página 108).

Tabela 4 Valores, média e desvio padrão da separação dentária em milímetros (mm) a cada período de medição para os grupos **placebo** e **experimental**.

GRUPO	Separação dentária (mm) nos dias de observação		
	3	7	14
<i>placebo</i>			
1	1,21		
2	1,15		
3	1,19		
4	1,16		
5	1,20	2,02	
6	1,28	2,10	
7	1,23	2,04	
8	1,25	2,00	
9	1,27	2,01	3,22
10	1,30	2,33	3,30
11	1,46	2,30	3,32
12	1,35	2,10	3,18
13	1,27	2,17	3,14
14	1,42	2,20	3,48
15	1,50	2,33	3,50
16	1,16	2,10	3,29
Média	1,28	2,14	3,30
Desvio-padrão	0,11	0,12	0,13
<i>experimental</i>			
1	2,45		
2	2,40		
3	2,25		
4	2,37		
5	2,65	3,48	
6	2,21	3,19	
7	2,25	3,22	
8	2,44	3,20	
9	2,33	3,10	5,56
10	2,29	3,41	5,33
11	2,42	3,35	5,63
12	2,55	3,50	5,79
13	2,25	3,18	5,62
14	2,39	3,19	5,65
15	2,30	3,15	5,57
16	2,51	3,23	5,70
Média	2,38	3,27	5,61
Desvio-padrão	0,12	0,13	0,13

Tabela 5 Teste de *Wilcoxon* para comparação das médias de separação dentária em milímetros (mm) e diferença da média (M) para os grupos **placebo** e **experimental**.

<i>Dia</i>	<i>Z</i>	<i>P-valor</i>	<i>Diferença (M)</i>
placebo			
0/3	-3,517	0,000	1,28
3/7	-3,062	0,002	0,86
7/14	-2,524	0,012	1,16
experimental			
0/3	-3,519	0,000	2,38
3/7	-3,061	0,002	0,89
7/14	-2,524	0,012	2,34

Tabela 6 Teste de *Mann-Whitney* para comparação das médias de separação dentária em milímetros (mm) e diferença da média (M) entre os grupos **placebo** e **experimental** nos dias de aferição.

<i>Dia</i>	<i>Z</i>	<i>P-valor</i>	<i>Diferença (M)</i>
3	-4,827	0,000	1,10
7	-4,162	0,000	1,12
14	-3,361	0,001	2,30

Tabela 7 Coeficiente linear de Spearman (r) entre peso e movimento dentário nos grupos **placebo** e **experimental**.

<i>Dia</i>	<i>Coeficiente de Correlação de Spearman (r)</i>	<i>N</i>	<i>P-valor</i>
placebo			
3	-0,350	16	0,897
7	-0,383	12	0,219
14	-0,095	8	0,823
experimental			
3	-0,229	16	0,394
7	-0,189	12	0,556
14	-0,286	8	0,493

Gráfico 2 Representação gráfica da taxa de movimentação dentária em milímetros (mm) por dia nos grupos **placebo** e **experimental**.

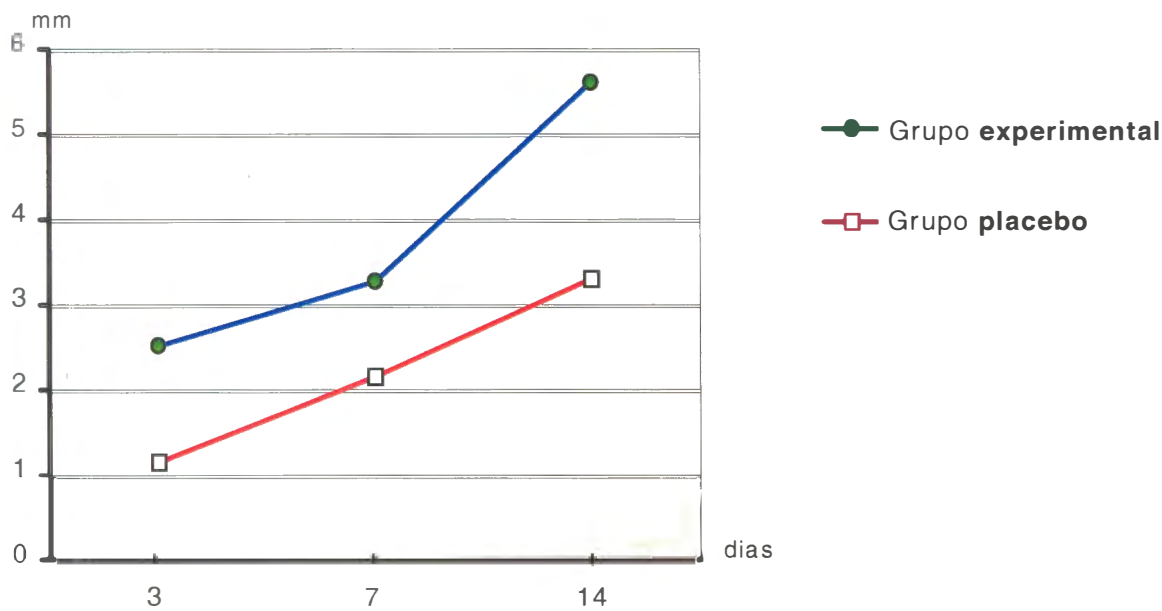
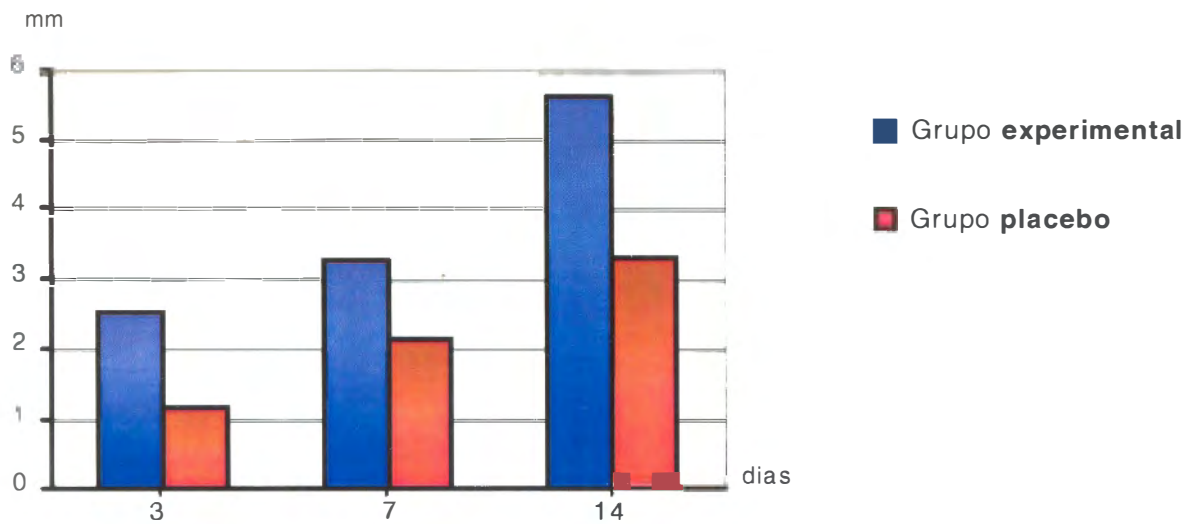


Gráfico 3 Histograma demonstrativo do movimento dentário em milímetros (mm) por dia para os grupos **placebo** e **experimental**.



5.3 ACHADOS HISTOLÓGICOS

5.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

5.3.1.1 Grupo **controle**

O cimento acelular que recobria as superfícies radiculares referentes ao lado distal apresentava aspecto de lisura superficial. Em aumentos maiores foram observadas depressões circulares resultantes da desagregação das fibras de Sharpey por não estarem totalmente calcificadas. Ao redor dessas depressões havia deposição de material mineral (Figura 7 A e B, página 112).

5.3.1.2 Grupo **placebo**

A análise topográfica realizada na superfície radicular, três dias após a aplicação da força, não demonstrou alterações no cimento acelular em comparação com o grupo **controle** (Figura 7 C e D, página 112).

Entretanto, os dentes dos animais sacrificados sete dias após a ativação apresentaram em suas superfícies radiculares, algumas áreas caracterizadas pela presença de fendas largas, esparsas e de pouca profundidade, sugerindo descalcificação do cimento acelular (Figura 7 E e F, página 112).

No 14^o dia de observação puderam ser detectadas algumas lesões rasas de coloração mais escura com aparência unilocular, restritas ao cimento, demonstrando avanço da descalcificação (Figura 7 G e H, página 112).

5.3.1.3 Grupo **experimental**

Alterações topográficas significativas foram observadas. Três dias após a aplicação da força, verificou-se a presença de lesões de pouca profundidade na superfície cementária. A tonalidade mais escura das lesões, evidenciada nas eletromicrografias, revelou o processo de descalcificação da superfície radicular (Figura 8 A e B, página 113).

Na superfície das raízes dos animais sacrificados sete dias após a ativação do aparelho, lacunas de absorção com aspecto unilocular foram identificadas. Áreas de descalcificação cementária ainda eram evidentes entre as lesões que apresentavam grau de profundidade significativo atingindo a dentina mais externa (Figura 8 C e D, página 113).

No 14^o, a superfície radicular apresentava sítios ativos de absorção, com grande extensão e aparência multilocular. Bordas íngremes de cimento com pouco suporte de dentina, por vezes, foram identificadas. Em aumentos maiores, pôde-se observar que o processo de absorção tinha se estendido apenas para as camadas mais superficiais da dentina (Figura 8 E e F, página 113). Ocasionalmente, pôde-se identificar, no fundo da lesão, indícios de deposição de tecido

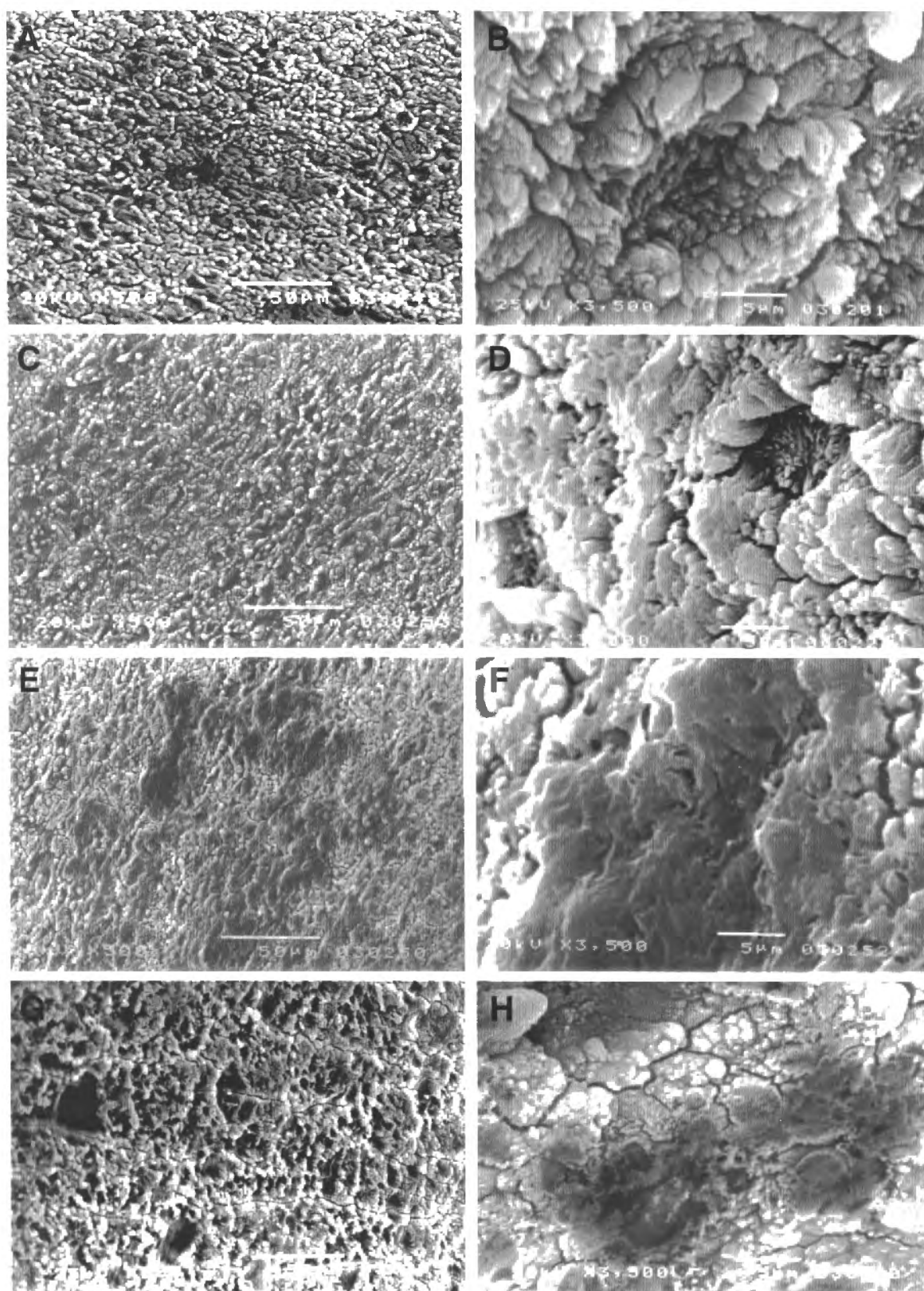


Figura 7 Eletromicrografias (MEV) das superfícies do cimento acelular. Grupo **controle**. **A e B)** depressões circulares após remoção das fibras de Sharpey. Grupo **placebo**. 3º dia: **C e D)** ausência de alterações topográficas. 7º dia: **E e F)** lesões superficiais restritas ao cimento. 14º dia: **G e H)** lesões rasas uniloculares. Aumento: 500X (à esquerda), 3500X (à direita).

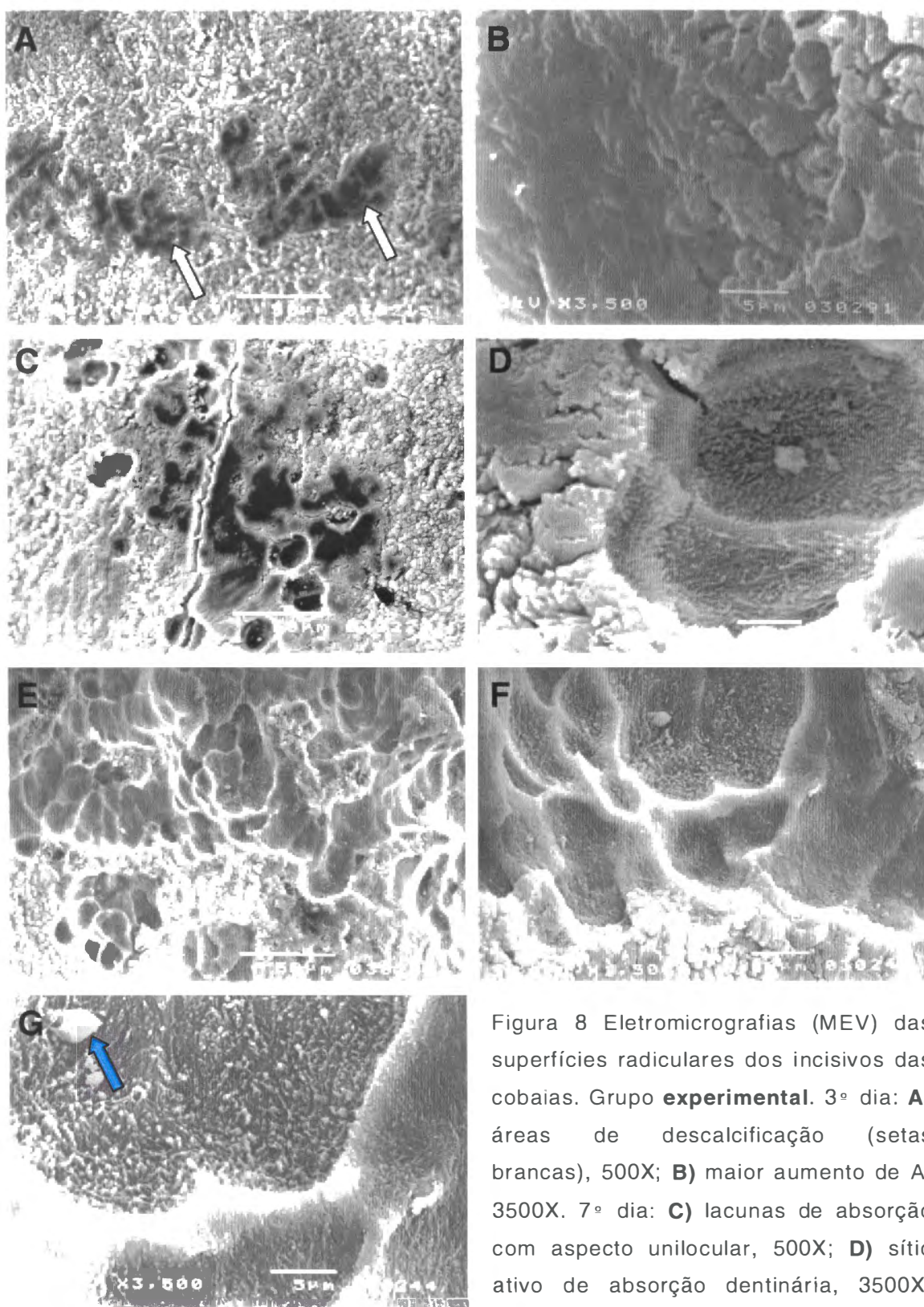


Figura 8 Eletromicrografias (MEV) das superfícies radiculares dos incisivos das cobaias. Grupo **experimental**. 3º dia: **A)** áreas de descalcificação (setas brancas), 500X; **B)** maior aumento de A, 3500X. 7º dia: **C)** lacunas de absorção com aspecto unilocular, 500X; **D)** sítio ativo de absorção dentinária, 3500X.

14º dia: **E)** lacunas com aparência multilocular, 500X; **F)** processo de absorção está limitado às camadas superficiais da dentina, 1500X; **G)** depósito granular mineral (seta azul), 3500X.

com aparência granular, sugerindo início de reparação mineral (Figura 8 G, página 113).

5.3.2 MICROSCOPIA DE LUZ

5.3.2.1 Grupo **controle**

O exame histológico do periodonto de sustentação dos animais que não foram submetidos à movimentação dentária ortodôntica mostrou características de normalidade (Figura 9, página 115). Grande concentração celular pôde ser observada, principalmente nas proximidades da superfície alveolar, com preponderância de fibroblastos. O cimento, do tipo acelular, adjacente à dentina, apresentava-se em camada delgada e uniforme, revestida por cementoblastos (células achatadas e com núcleo pouco evidente). Na área intermediária do ligamento periodontal, entre cimento e osso alveolar, os feixes de fibras colágenas desenhavam trajeto ondulado. Entre os cementoblastos passavam as fibras colágenas com inserção no cimento, as fibras de Sharpey.

A cortical interna do alvéolo mostrava contorno relativamente liso e regular, exceto por perfurações que podiam ser observadas na superfície óssea, devido à irrigação proveniente dos espaços medulares subjacentes, penetrando no ligamento periodontal. O tecido ósseo calcificado estava recoberto por camada de osso fasciculado (imaturo) onde fibras de Sharpey se inseriam. Superficialmente a este, havia

deposição de delgada camada de tecido osteóide recoberta por osteoblastos alinhados ao longo da mesma.

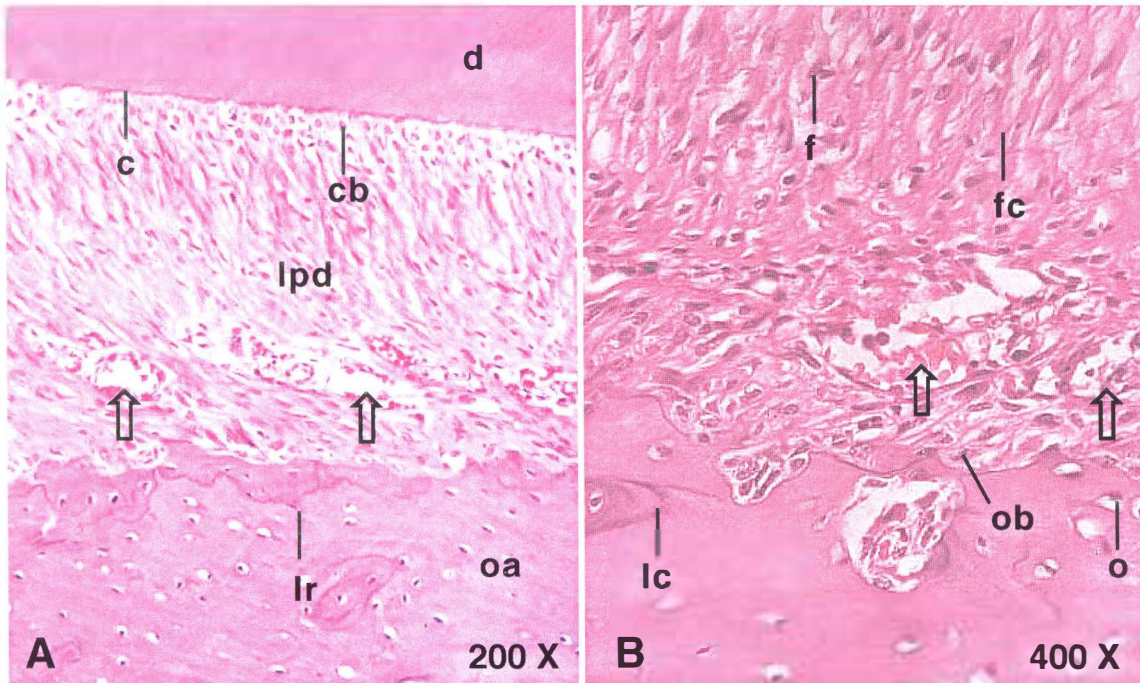


Figura 9 Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo **controle**: **A)** arranjo normal do ligamento periodontal e seu relacionamento com o osso alveolar e cemento adjacentes. Rica vascularização nas proximidades do osso alveolar (setas vazadas); **B)** numerosos fibroblastos com distribuição e orientação paralela aos feixes de fibras colágenas. Coloração **HE**, **d** - dentina; **c** - cemento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **fc** - feixe de fibras colágenas; **ob** - osteoblasto; **cb** - cementoblasto; **f** - fibroblasto; **lc** - lamela concêntrica; **o** - osteócito; **lr** - linha reversa; \uparrow vaso sangüíneo.

Outras células como osteoblastos e osteoclastos foram identificadas nas proximidades do osso alveolar. Os fibroblastos presentes apresentavam núcleos alongados e orientados na mesma direção das fibras colágenas. Rico suprimento vascular e feixes vâsculo-nervosos foram observados entre as fibras colágenas.

A atividade rítmica de aposição óssea era evidenciada por linhas incrementais, de aspecto quase retilíneo, separando as sucessivas camadas ósseas depositadas. Linhas reversas (irregulares e de aspecto sulcado) indicavam a existência de prévia absorção óssea. Esses aspectos indicavam o remodelamento fisiológico da região. Na região central do processo alveolar o osso era constituído por finas trabéculas ósseas, formadas por lamelas concêntricas, onde os osteócitos distribuíam-se.

5.3.1.2 Grupo **placebo**

O periodonto de sustentação dos animais pertencentes a esse grupo, cujos dentes sofreram movimentação ortodôntica, porém sem receberem qualquer medicação, apresentou importantes diferenças na comparação dos preparos obtidos dos animais sacrificados no 3º, 7º e 14º dia após a aplicação da força.

a) animais sacrificados no 3º dia após a ativação

Após este período, verificou-se que no lado de pressão correspondente à face distal dos incisivos, houve diminuição na largura do espaço do ligamento periodontal. Os feixes de fibras colágenas encontravam-se comprimidos e com disposição paralela à superfície alveolar. A cortical interna do alvéolo apresentou áreas típicas de zonas de pressão, com contorno irregular, de aspecto denteado, onde

inúmeras lacunas de Howship, que alojavam osteoclastos ativos, eram bem evidentes, denotando absorção óssea frontal. O calibre dos vasos sanguíneos, próximos a superfície óssea, estava aumentado. Os espaços medulares apresentavam-se normais indicando ausência de absorção óssea solapante durante o movimento ortodôntico (Figura 10 A e B, página 119).

No lado de tração, o espaço do ligamento periodontal estava alargado. As fibras colágenas apresentavam-se levemente estiradas e havia aumento tanto da irrigação como da densidade celular nas proximidades do osso alveolar. Havia predomínio de fibroblastos alinhados na direção dos feixes de fibras colágenas. Osteoblastos foram identificados junto à superfície óssea (Figura 10 C e D, página 119).

b) animais sacrificados no 7º dia após a ativação

No lado de pressão do periodonto de sustentação pôde-se visualizar a acentuada celularidade do ligamento periodontal. A proliferação vascular era eminente, sendo observados vasos sanguíneos dilatados próximos à superfície óssea, conferindo boas condições de suprimento vascular. Os feixes de fibras colágenas, entretanto, ainda não apresentavam orientação definida (Figura 11 A e B, página 120).

O aspecto histológico no lado de tração mostrou reorganização parcial do tecido periodontal e visível processo de regeneração óssea. Os feixes de fibras colágenas mantinham-se moderadamente distendidas. Foram observados muitos osteoblastos com núcleos

volumosos e intensamente corados, indicando intensa formação óssea junto à cortical interna do alvéolo. O padrão de deposição e calcificação do tecido ósseo era caracterizado por espículas ósseas com aspecto irregular projetando-se para o interior do ligamento. Entre as espículas ósseas havia feixes de fibras colágenas remanescentes, além de vasos sangüíneos e células como fibroblastos e osteoblastos. Nos locais onde inexistia neoformação óssea, as fibras colágenas apresentavam-se menos estiradas (Figura 11 C e D, página 120).

c) animais sacrificados no 14^o dia após a ativação

No lado de pressão, o ligamento periodontal ainda sob compressão, apresentava fibras colágenas com arranjo perpendicular ao osso, indicando início do processo de reestruturação. A vascularização mostrava-se acentuada e os feixes vâsculo-nervosos estavam mais próximos à região central do ligamento periodontal. Não foi constatada evidência de atividade osteoclástica. No interior das áreas socavadas havia a presença de várias células mononucleares e osteoblastos ativos, o que sugere formação de matriz óssea com projeção de espículas para dentro do ligamento (Figura 12 A e B, página 121).

No lado de tração do ligamento, ocorreu considerável aumento da concentração celular, com inúmeros fibroblastos, caracteristicamente ativos, distribuídos ao longo dos feixes de fibras colágenas. Osteoblastos recobriam a camada de osteóide depositada sobre o tecido recém mineralizado, o qual formava espículas ósseas projetando-se em

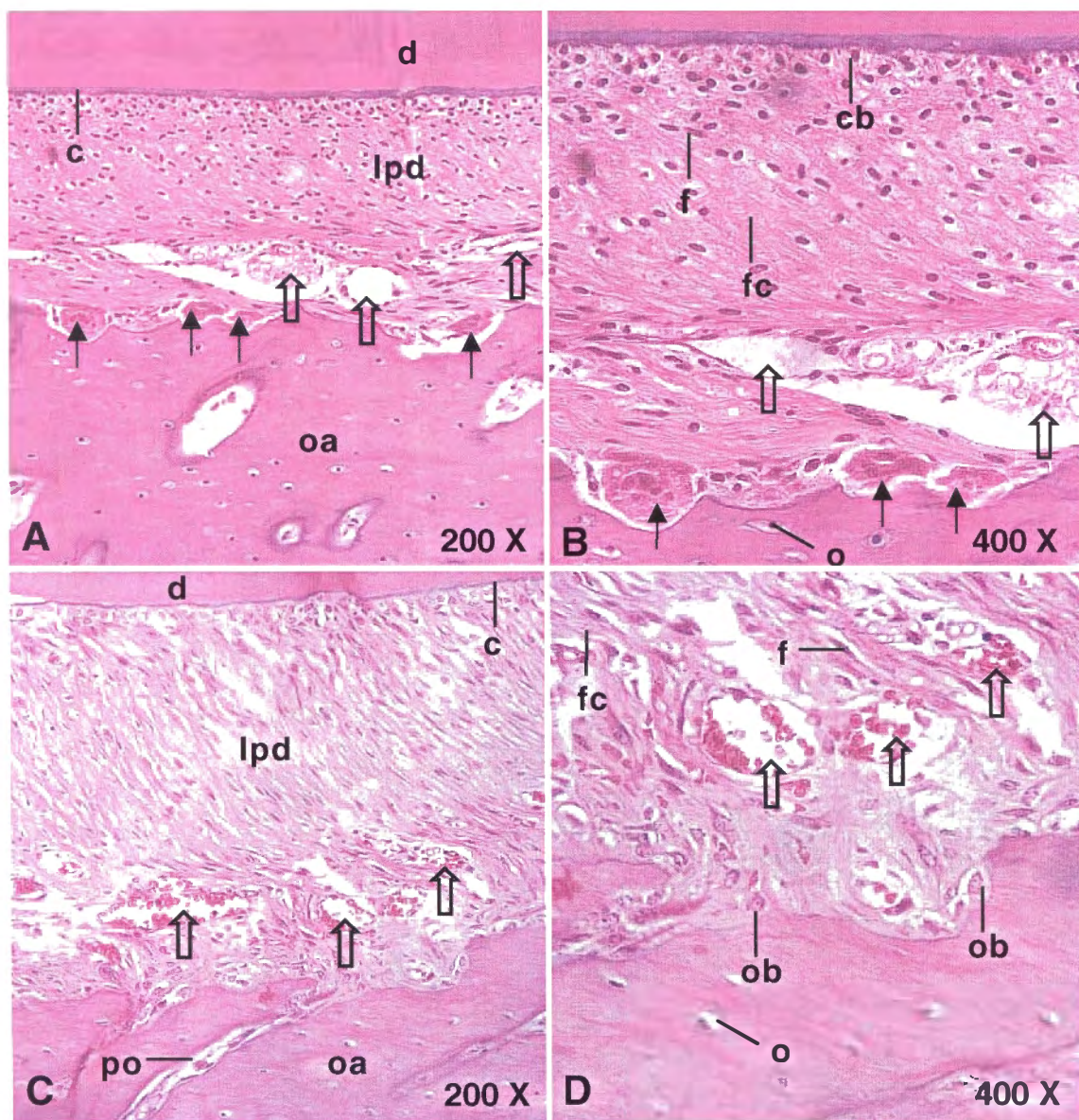


Figura 10 Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo **placebo** no 3.^o dia após aplicação da força. Lado de pressão: **A)** visão geral do ligamento periodontal demonstrando intensa absorção óssea frontal e feixes de fibras colágenas comprimidas entre o cimento e osso alveolar; **B)** osteoclastos situados ao longo da superfície da cortical interna do osso alveolar. Lado de tração: **C)** notável estiramento dos feixes de fibras do ligamento periodontal e rica vascularização junto ao osso; **D)** observar o aumento e dispersão das células novas, especialmente nas áreas próximas da superfície óssea e adjacente aos feixes de fibras estiradas. Coloração HE, d - dentina; c - cimento; lpd - ligamento periodontal; oa - osso alveolar; fc - feixe de fibras colágenas; ob - osteoblasto; cb - cementoblasto; f - fibroblasto; po - perfuração óssea; o - osteócito; ↑ vaso sanguíneo; ↑ osteoclasto.

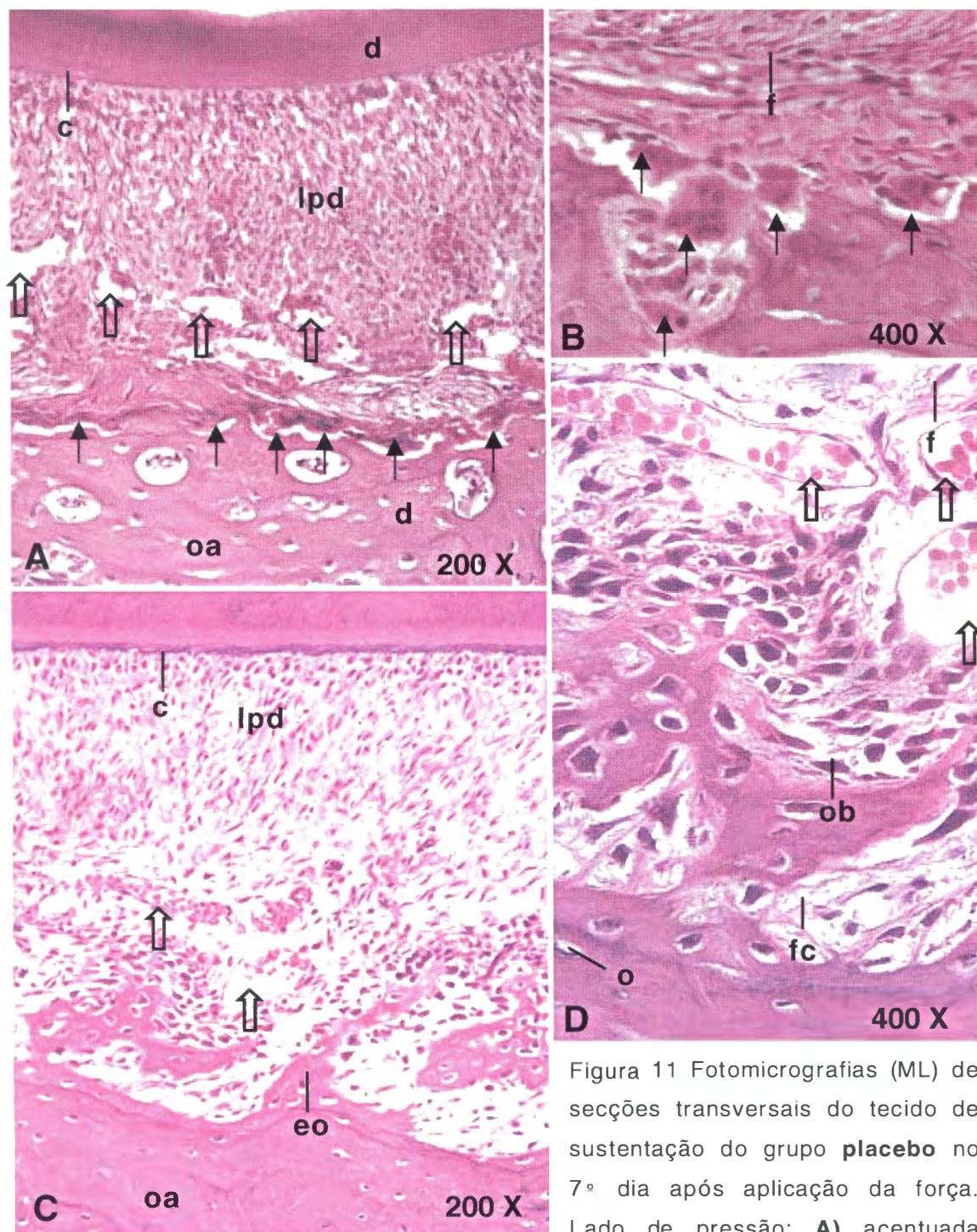


Figura 11 Fotomicrografias (ML) de secções transversais do tecido de sustentação do grupo **placebo** no 7º dia após aplicação da força. Lado de pressão: **A)** acentuada

angiogênese e extensa absorção óssea frontal; **B)** osteoclastos no interior das lacunas de Howship. Lado de tração: **C)** notável formação óssea e alta celularidade em toda extensão do ligamento periodontal; **D)** cadeia de osteoblastos cobrindo a camada óssea parcialmente calcificada. Coloração HE, d - dentina; c - cimento; lpd - ligamento periodontal; oa - osso alveolar; eo - espícula óssea; ob - osteoblasto; f - fibroblasto; fc - feixe de fibras colágenas; o - osteócito; ↑ vaso sanguíneo; ↑ osteoclasto.

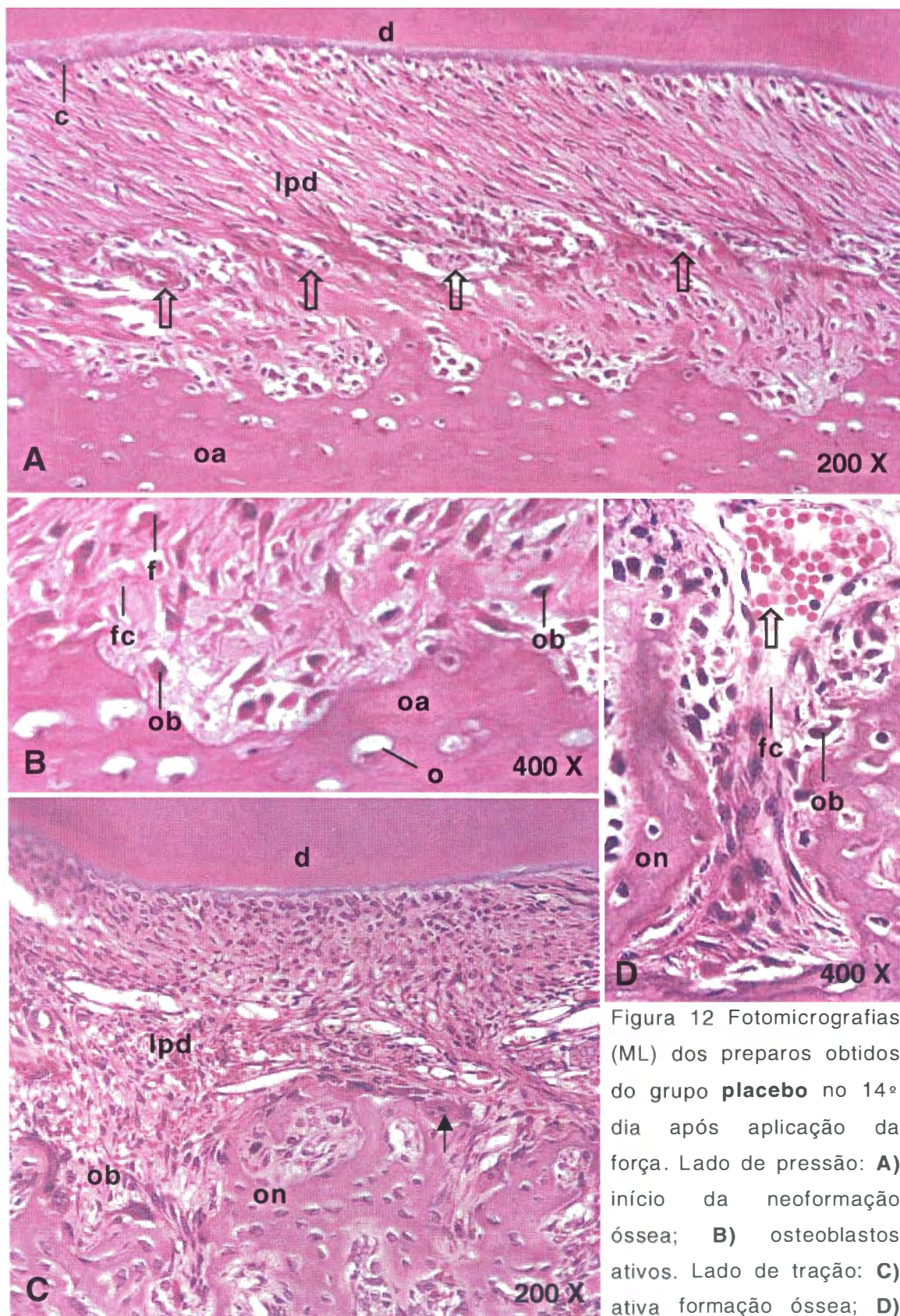


Figura 12 Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo **placebo** no 14º dia após aplicação da força. Lado de pressão: **A)** início da neoformação óssea; **B)** osteoblastos ativos. Lado de tração: **C)** ativa formação óssea; **D)** aprisionamento de osteoblastos na matriz óssea. Coloração HE, **d** - dentina; **c** - cimento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **on** - osso neoformado; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; **o** - osteócito; \hat{u} vaso sanguíneo; \uparrow osteoclasto.

aprissonamento de osteoblastos na matriz óssea. Coloração HE, **d** - dentina; **c** - cimento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **on** - osso neoformado; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; **o** - osteócito; \hat{u} vaso sanguíneo; \uparrow osteoclasto.

direção ao espaço periodontal. As trabéculas ósseas formadas agregavam-se uma às outras por justaposição, diminuindo a largura do ligamento periodontal anteriormente distendido. Eventualmente constatou-se a presença de osteoclastos, caracterizando atividade de remodelamento das novas trabéculas ósseas formadas(Figura 12 C e D, página 121).

5.3.1.3 Grupo **experimental**

O periodonto de sustentação dos animais submetidos à administração de diazepam, cujos dentes também sofreram movimentação ortodôntica, apresentou distintas e notáveis alterações quando comparadas aos demais grupos.

a) animais sacrificados 3^o dia após a ativação

Ao contrário do que foi observado no grupo placebo, no lado de pressão já havia significativo aumento na largura do espaço do ligamento periodontal. * Os feixes de fibras colágenas estavam dissociados, principalmente na região central do ligamento, com poucos fibroblastos identificados. A superfície periosteal da cortical alveolar interna apresentou-se recoberta por osteoclastos ativos dispostos em cadeia, caracterizando intensa atividade de absorção óssea frontal e progressivo avanço da frente absorptiva. Proliferação vascular associada à vasodilatação também foi identificada nas adjacências do osso

alveolar e na região central do ligamento periodontal. Outros sinais de hialinização estavam ausentes (Figura 13 A e B, página 124).

No lado de tração, o ligamento periodontal mostrou-se extremamente alargado, havendo espaços claros entre os feixes de fibras colágenas estirados. Próximo ao osso alveolar havia escassez de fibras de Sharpey. Dissociação de fibras colágenas foram observadas na região central do ligamento. Expressiva redução na quantidade de osteoblastos foi observada em relação ao grupo **controle**, no 3º dia de experimento (Figura 13 C e D, página 124).

b) animais sacrificados 7º dia após a ativação

No lado de pressão, os vasos sanguíneos ainda estavam dilatados. Desorganização tecidual e baixa celularidade foram observadas nas regiões central e adjacente ao osso alveolar. As áreas escavadas e erodidas na superfície alveolar eram abundantes (Figura 14 A e B, página 125).

As reações teciduais no lado de tração apresentavam padrão de mudança mais lento, se comparado ao grupo **placebo**. Observou-se expressivo aumento em largura do ligamento periodontal e a concentração celular mostrou-se bem menos expressiva nas áreas adjacentes ao osso alveolar, com poucos osteoblastos observados, o que denota baixa atividade de formação óssea na região. Os feixes de fibras colágenas e as células do ligamento periodontal mantinham-se sem orientação definida (Figura 14 C e D, página 125).

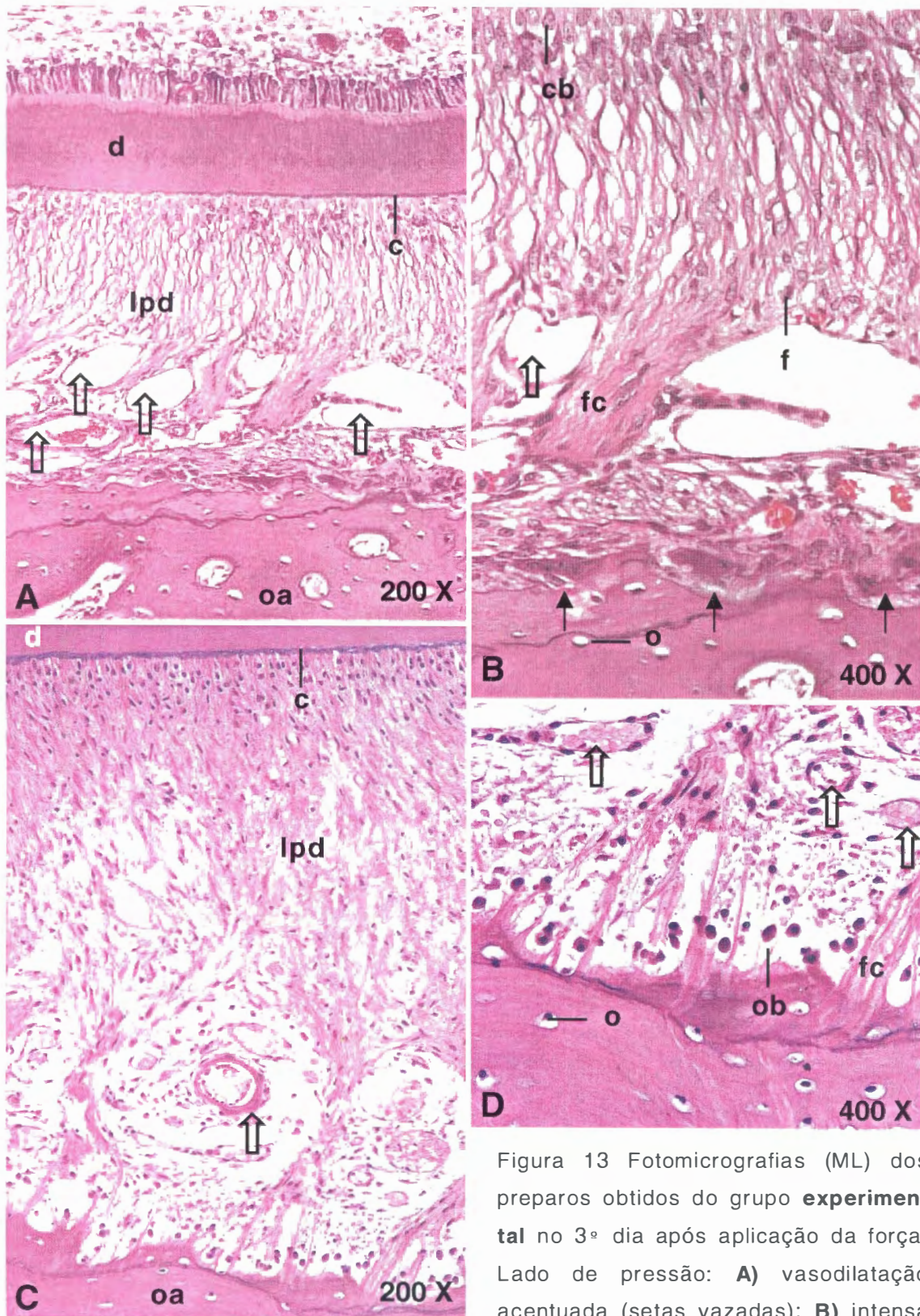


Figura 13 Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo **experimental** no 3º dia após aplicação da força. Lado de pressão: **A)** vasodilatação acentuada (setas vazadas); **B)** intensa absorção óssea. Lado de tração: **C)** presença de espaços claros; **D)** baixa celularidade nas proximidades da superfície óssea. Coloração **HE**, **d** - dentina; **c** - cimento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **cb** - cementoblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; **o** - osteócito; \uparrow vaso sanguíneo; \uparrow osteoclasto.

Lado de pressão: **A)** vasodilatação acentuada (setas vazadas); **B)** intensa absorção óssea. Lado de tração: **C)** presença de espaços claros; **D)** baixa celularidade nas proximidades da superfície óssea. Coloração **HE**, **d** - dentina; **c** - cimento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **cb** - cementoblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; **o** - osteócito; \uparrow vaso sanguíneo; \uparrow osteoclasto.

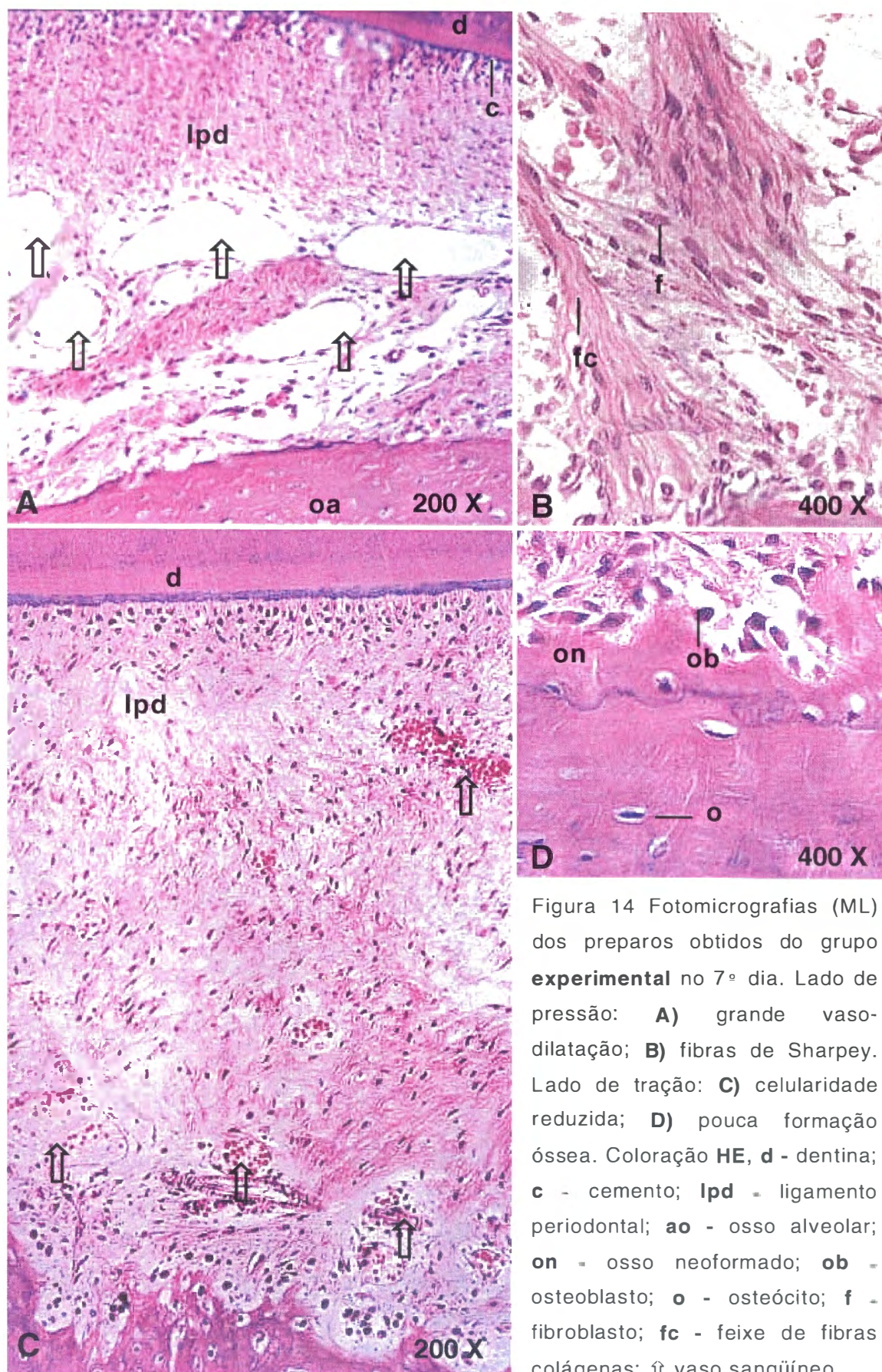


Figura 14 Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo **experimental** no 7º dia. Lado de pressão: **A)** grande vasodilatação; **B)** fibras de Sharpey. Lado de tração: **C)** celularidade reduzida; **D)** pouca formação óssea. Coloração HE, **d** - dentina; **c** - cemento; **lpd** - ligamento periodontal; **ao** - osso alveolar; **on** - osso neoformado; **ob** - osteoblasto; **o** - osteócito; **f** - fibroblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; $\uparrow\uparrow$ vaso sanguíneo.

c) animais sacrificados 14º dia após a ativação

No lado de pressão, o espaço do ligamento periodontal apresentou-se ainda maior em largura. Embora áreas ativas de absorção óssea já não fossem identificadas, poucos osteoblastos se mostravam presentes e discreta formação óssea pôde ser observada. Na região central do ligamento, a desorganização dos feixes de fibras colágenas, a escassez de fibroblastos e o predomínio de vasos sangüíneos bem dilatados eram evidentes (Figura 15 A e B, página 127).

No lado de tração, o aumento em largura do espaço do ligamento periodontal tornou-se ainda mais expressivo. Vasos sangüíneos estavam presentes em toda extensão do ligamento, porém em concentração maior na região próxima à cortical interna do osso alveolar. Os feixes de fibras colágenas ainda apresentavam-se desorganizados e dissociados, principalmente na região central do ligamento, onde também se pôde observar pouca concentração de fibroblastos. Embora tenham sido identificados osteoblastos na superfície do osso alveolar, estes, aparentemente não apresentavam atividade significativa (Figura 16 A e B, página 128).

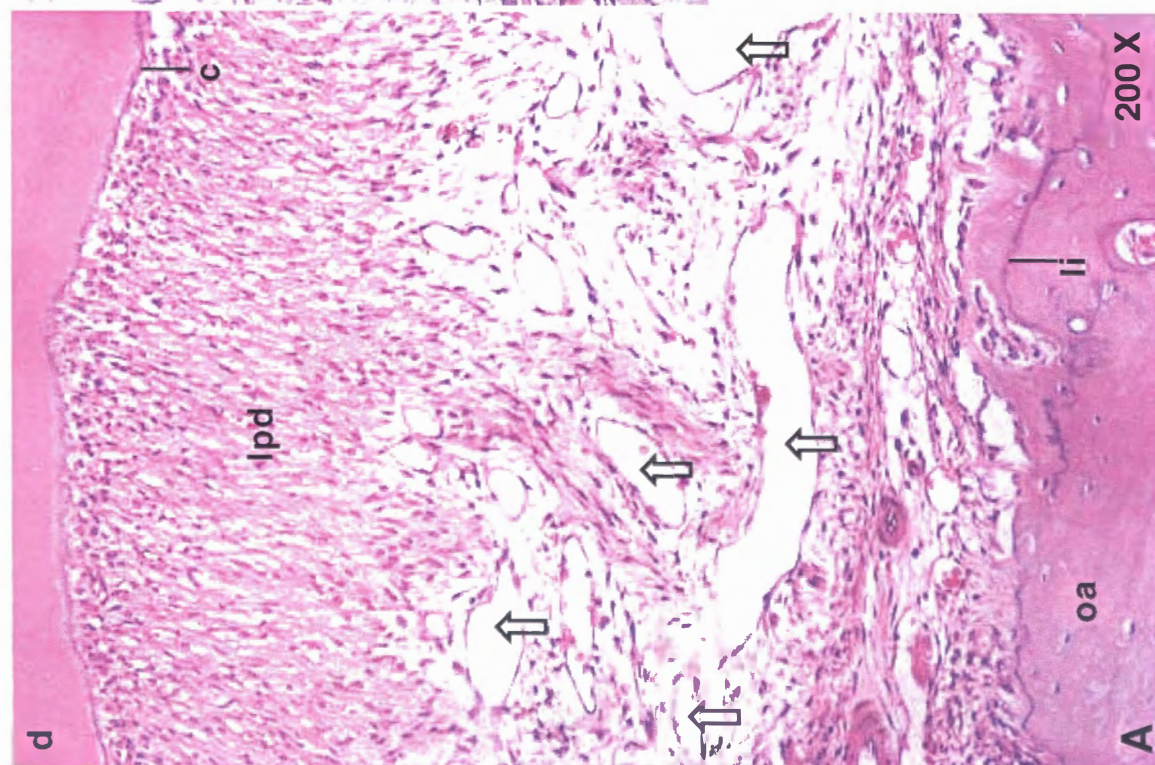
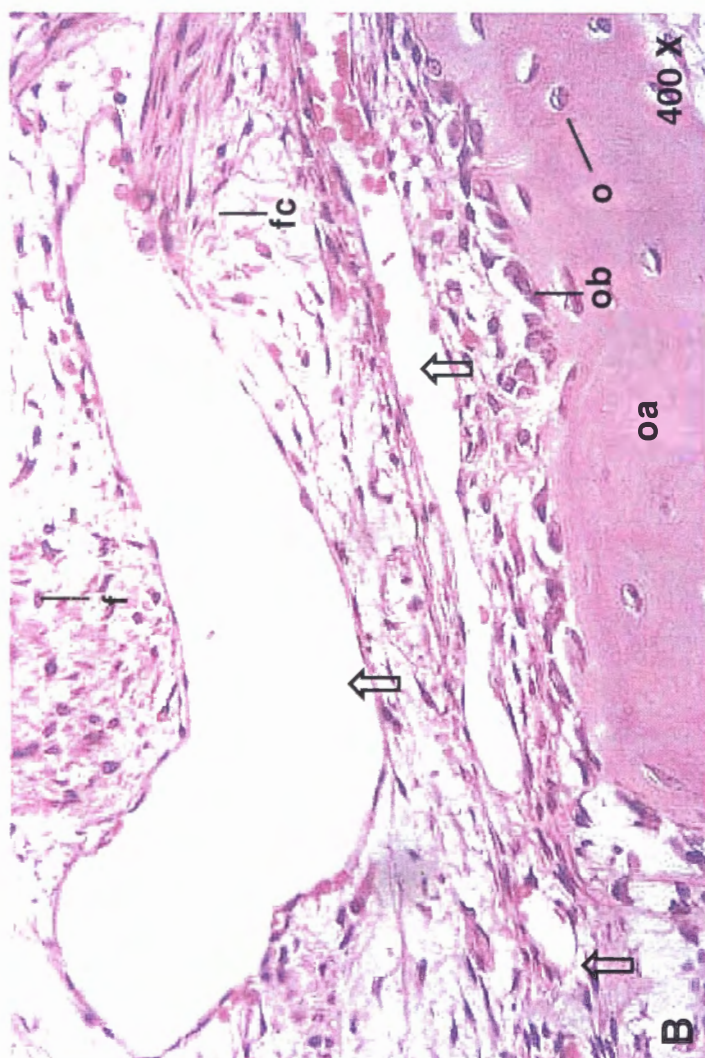


Figura 15 Fotomicrografias (ML) dos preparos obtidos do grupo **placebo** no 14º dia após aplicação da força. Lado de pressão: **A)** notar acentuado alargamento do ligamento periodontal e proliferação de vasos sanguíneos dilatados na região central do ligamento. Não há evidência de atividade osteoclástica. **B)** indícios de formação óssea. Coloração **HE**, **d** - dentina; **c** - cimento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **fc** - feixe de fibras colágenas; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **li** - linha incremental; **o** - osteócito; \updownarrow vaso sanguíneo.

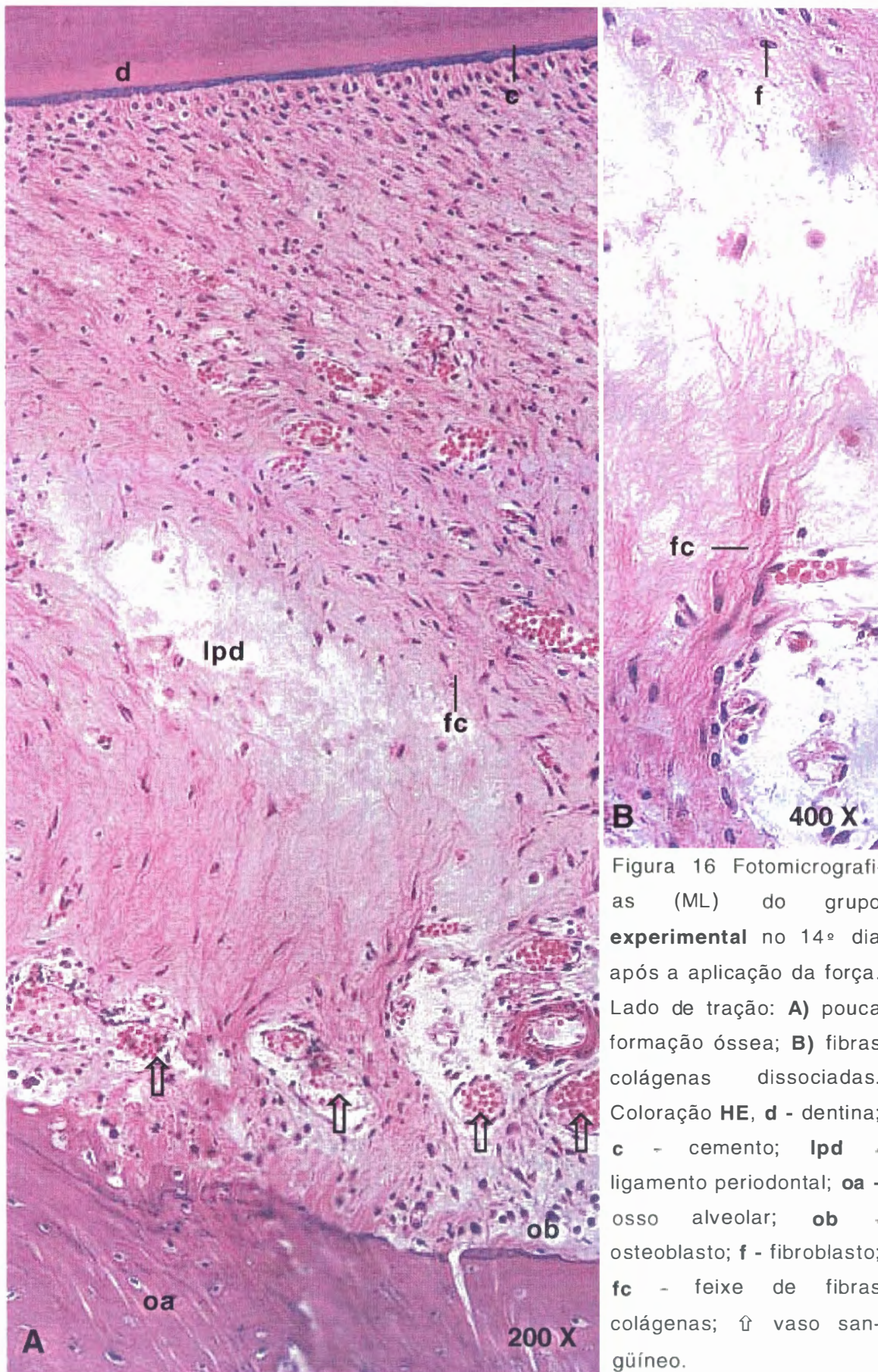


Figura 16 Fotomicrografias (ML) do grupo **experimental** no 14º dia após a aplicação da força. Lado de tração: **A)** pouca formação óssea; **B)** fibras colágenas dissociadas. Coloração HE, **d** - dentina; **c** - cemento; **lpd** - ligamento periodontal; **oa** - osso alveolar; **ob** - osteoblasto; **f** - fibroblasto; **fc** - feixe de fibras colágenas; ↑ vaso sanguíneo.

5.3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

5.3.3.1 Grupo **controle**

O aspecto ultraestrutural dos elementos do ligamento periodontal dos animais desse grupo está ilustrado na Figura 17, página 139; Figura 18, página 140; e Figura 19, página 141.

Na região central do ligamento periodontal e nas proximidades do osso alveolar, predominavam os fibroblastos, cujos prolongamentos citoplasmáticos se afilavam nas extremidades. Essas células, com extenso e bem polarizado citoplasma, continham abundantes organelas, tais como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, além de muitos grânulos de secreção contendo fibrilas de colágeno destinadas à exportação. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso estavam dispostas de forma paralela, com grandes grupos de ribossomas aderidos às suas membranas. O complexo de Golgi apresentava-se, em geral, próximo ao núcleo variando em extensão e complexidade. Grandes e numerosas mitocôndrias, apresentando cristas irregulares, estavam distribuídas pelo citoplasma celular. A maioria dos fibroblastos continha núcleos grandes e ovóides, com um ou mais nucléolos, ocupando grande parte do volume celular, exceto por algumas células com alta proporção citoplasma-núcleo, denotando grande atividade de síntese de proteínas.

Os cementoblastos eram vistos próximos ao cimento, geralmente em duas ou três camadas de células, com grande proximidade entre as membranas celulares dos mesmos. Essas células localizadas junto ao

cimento caracterizavam-se pela presença de processos citoplasmáticos se estendendo em direção à periferia cementária. O núcleo tinha aspecto arredondado e era freqüente a presença de poros na membrana nuclear. As organelas eram distribuídas moderadamente pelo citoplasma celular. O retículo endoplasmático rugoso consistia de cisternas contendo material amorfo. O complexo de Golgi embora escasso, apresentava numerosos perfis vesiculares. Vacúolos e grânulos eletrodensos foram encontrados dispersos pelo citoplasma. As mitocôndrias estavam distribuídas uniformemente pelo citoplasma, tendo tamanho e quantidade reduzida. As fibras colágenas próximas à superfície cementária apresentavam maior densidade quando comparadas às próximas ao osso alveolar.

Devido ao remodelamento ósseo fisiológico, alguns osteoclastos podiam ser vistos sobre a superfície óssea. Essas células apresentavam algumas diferenças ultraestruturais entre si relacionadas à sua atividade de absorção óssea. Identificados facilmente pelo seu grande tamanho e pela presença de vários núcleos localizados na região basal, os osteoclastos quando ativos, apresentavam citoplasma caracterizado pela distribuição perinuclear de numerosas e pleomórficas mitocôndrias, ribossomas livres não associados à membrana (livres ou em grupos) e múltiplos complexos de Golgi contendo vesículas de transporte. O retículo endoplasmático rugoso esparso, mas bem desenvolvido foi encontrado na porção basal do citoplasma e nos envelopes perinucleares. A superfície celular, próxima à cortical interna do osso alveolar, sob absorção ativa, era composta de uma série de processos

citoplasmáticos correspondendo à borda em escova. Múltiplas estruturas vacuolares de tamanhos e formas heterogêneas estavam concentradas entre a borda e os núcleos, resultado do seccionamento oblíquo do espaço extracelular através das projeções citoplasmáticas da referida borda. O citoplasma situado no interior desses prolongamentos continha somente filamentos finos. No espaço extracelular dessas invaginações foram observados alguns cristais minerais e uma mistura de fibrilas de colágeno. Sobre a superfície óssea côncava parcialmente decomposta, conhecida como lacuna de Howship, repousava a borda em escova pouco desenvolvida e que era rodeada por uma zona clara, livre organelas, mas que continha filamentos no seu interior. Essa estrutura parecia ancorar a área da borda em escova à superfície óssea sob absorção.

A interface osteoclasto-osso apresentava-se mais clara e nesse local, fibras colágenas foram identificadas demonstrando que a fase mineral é solubilizada antes da degradação do colágeno. Células indiferenciadas mononucleares semelhantes aos fibroblastos e aos osteoblastos foram encontradas em íntimo contato com os osteoclastos. Essas células conhecidas como células companheiras apresentavam núcleo grande e oval, retículo endoplasmático paralelo ou tubular curto, complexo de Golgi bem desenvolvido, mitocôndrias e corpos densos dispersos no citoplasma. Poucos osteoclastos quiescentes também puderam ser observados junto às lacunas de absorção pouco profundas. Estes apresentavam um número bastante reduzido de organelas e ribossomas, além de uma superfície celular quase isenta de

invaginações. Tais características podem representar o estágio degenerativo dessas células.

Poucos osteoblastos ativos típicos foram encontrados dispersos nas proximidades da superfície interna do osso alveolar. Essas células apresentavam aspecto ovóide ou fusiforme e núcleo bem evidente contendo geralmente mais de um nucléolo e circundado por cromatina marginal. Largos poros nucleares também foram identificados. O citoplasma bem definido continha organelas abundantes e bem desenvolvidas, grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas e ribossomas livres, característica relacionada à função de produção de colágeno e matriz extracelular. Extenso complexo de Golgi com sáculos achatados típicos foi observado próximo ao núcleo. Nas proximidades do retículo endoplasmático rugoso havia numerosas mitocôndrias. A matriz extracelular apresentava feixes de fibras colágenas onde a substância fundamental embebia as fibrilas. A superfície do osso alveolar, menos eletrodensa, caracterizava a camada de osteóide.

Embora os processos osteoblásticos fossem mais numerosos nessa camada, também estavam presentes nas camadas mais profundas. A zona de transição entre o osteóide e o osso mineralizado mostrava-se bem marcada. Pequenas partículas densas foram vistas ao longo da superfície das fibras colágenas e no interior das mesmas, quando cortadas transversalmente. As fibras colágenas mineralizadas agrupavam-se formando feixes inseridos no osso de forma aleatória.

No interior do tecido mineralizado ou em mineralização foram encontrados osteócitos ocupando lacunas individuais, que se comunicavam entre si por numerosos e extensos processos citoplasmáticos. A superfície celular e os processos dos osteócitos eram separados por camada de material amorfo do osso circunjacente. O núcleo era caracterizado pela presença de poro nuclear, um ou dois nucléolos, escasso retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi pouco desenvolvido. Em estreita aposição à membrana celular percebia-se a lâmina osmiofílica representando a matriz óssea calcificada. As dilatações irregulares do retículo endoplasmático rugoso continham moderada quantidade de material amorfo denso. As mitocôndrias, pouco numerosas, tinham aspecto arredondado e/ou oval e apresentavam poucas cristas. Pequenas vesículas semelhantes às encontradas nos osteoblastos estavam dispersas aleatoriamente no interior do escasso citoplasma.

5.3.3.2 Grupo **placebo**

A maioria dos fibroblastos apresentava citoplasma com configuração alongada e bem polarizada com extensas áreas de contato com fibras colágenas, especialmente nas áreas de tração, próximo à superfície do osso alveolar (Figura 22 C, página 144). Esses fibroblastos continham grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvido, indicando alta taxa de síntese proteica. Em geral, o núcleo situava-se numa das extremidades do

fibroblasto, o complexo de Golgi na posição central e abundante retículo endoplasmático rugoso na outra extremidade. O longo eixo celular apresentava orientação paralela às fibras colágenas adjacentes (Figura 22 D, E e F, página 144). Em áreas distantes dos tecidos duros foram observados leves espaçamentos entre os grupos de fibras colágenas dispostas paralelamente aos fibroblastos (Figuras 20 E, página 142). Nas áreas de pressão, os fibroblastos apresentavam retículo endoplasmático rugoso com marcada dilatação e corpos densos em seu citoplasma (Figura 20 F, página 142).

Osteoclastos ativos eram freqüentes na superfície óssea e apresentavam bordas em escova e tamanho maiores que os do grupo **controle** (Figura 20 A, página 142). As células companheiras eram semelhantes às do grupo **controle** (Figura 21 B e C, página 143).

O exame das regiões adjacentes ao cimento revelou fibras colágenas intactas inseridas no cimento em vários ângulos. Os cementoblastos apresentavam prolongamentos citoplasmáticos em íntima relação com o cimento, tanto no lado de pressão como nos lados de tração, de modo semelhante ao observado nos grupos **controle** (Figura 20 G, página 142 e Figura 21 A, B e C, página, 143).

No lado de tração, a maioria das células próximas à superfície óssea, apresentou características típicas de osteoblastos ativos. Estes apresentavam forma cuboidal, núcleo excêntrico, complexos de Golgi bem desenvolvidos ocupando a porção central do citoplasma, abundante retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas e numerosas pequenas vesículas dispersas pelo citoplasma, indicando síntese e

secreção de proteínas. Alguns osteoblastos estavam bem próximos à superfície óssea, enquanto outros apresentavam processos citoplasmáticos delgados que penetravam no osteóide recém-produzido. Na junção osteoblasto-osteóide havia delgadas fibras colágenas próxima à superfície celular. (Figura 21 D e E, página 143). Alterações no sistema de adesão das fibras colágenas ao dente e à superfície óssea não foram observadas (Figura 21 F, página 143). Os osteócitos mantiveram características morfológicas semelhantes aos do grupo **controle** (Figura 22 A e B, página 144).

5.3.3.3 Grupo **experimental**

O aspecto ultraestrutural das zonas de pressão caracterizava-se pela presença de áreas claras no ligamento periodontal, porém estas áreas eram menos evidentes do que as encontradas no lado de tração (Figura 23 A, página 145). Alterações celulares foram identificados nos cementoblastos e fibroblastos. Os cementoblastos alterados apresentavam corpos densos, com poucas mitocôndrias, escassos retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, além de rompimento da membrana citoplasmática provocando a liberação dos componentes citoplasmáticos no espaço extracelular (Figura 24 A, B e C, página 146). Fibroblastos com indícios de degradação celular (Figura 23 B, página 145), caracterizavam-se pelas mitocôndrias dilatadas, desgranulação e escassez do retículo endoplasmático. Alguns fibroblastos embora apresentassem membranas celulares íntegras e

núcleos grandes, possuíam escasso retículo endoplasmático, organelas e complexo de Golgi pouco desenvolvidos (Figura 23 A, página 145).

Nas áreas de absorção óssea ativa, o osso alveolar adjacente sofreu progressiva desmineralização, porém algumas fibras colágenas sobreviveram ao processo destrutivo, mantendo continuidade direta com as fibras da matriz óssea e assim, a contínua adesão do ligamento periodontal na superfície óssea.

Lacunas de Howship isentas de osteoclastos puderam ser identificadas na superfície alveolar adjacentes aos osteoclastos ativos em novos sítios de absorção óssea, o que sugere que os osteoclastos migraram pela superfície óssea para ocupar novo sítio de absorção (Figura 23 F, página 145). Não foram encontrados osteoclastos em estágio de degeneração ou inativos. No interior das lacunas isentas de osteoclastos havia feixes de fibras colágenas inseridas no osso alveolar dirigindo-se para o interior do ligamento. Os osteoclastos ativos eram bem maiores, apresentando maior número de núcleos e organelas que os grupos anteriores (Figura 23 C, página 145). As mitocôndrias abundantes e exuberantes estavam dispersas pelo citoplasma, exceto na borda em escova (Figura 23 E, página 145). O complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso eram bem desenvolvidos e pôde-se observar um aumento de ribossomas livres. A característica mais marcante na diferenciação entre os osteoclastos dos demais grupos encontrava-se na borda em escova, cujos processos citoplasmáticos eram dramaticamente maiores em largura e profundidade, o que aumentava a superfície de absorção (Figura 23 D, página 145). Células

companheiras, semelhantes às dos grupos **controle** e **placebo**, estavam presentes.

No lado de tração do ligamento periodontal observou-se baixa celularidade (Figura 24 D, página 146). Havia rompimento e espaçamento dos feixes de fibras colágenas. O espaço extracelular era caracterizado por zonas claras entre as células, indicando edema (Figura 26 A, página 148). Alguns fibroblastos e cementoblastos apresentavam desintegração e ruptura da membrana citoplasmática levando à perda parcial ou completa do conteúdo citoplasmático que ficavam dispersos no espaço extracelular (Figura 24 E, página 146). Os núcleos dos fibroblastos afetados mostravam considerável variação no contorno e tamanho (Figura 26 B, página 148). Os cementoblastos apresentavam poucas organelas dispersas pelo citoplasma. O retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi eram pouco desenvolvidos (Figura 24 E, página 146).

Foram identificadas alterações nos osteoblastos localizados próximos à superfície óssea, tais como dilatação do retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias edemaciadas com cristas distorcidas, separadas e desorganizadas e apresentando menor eletrodensidade que as mitocôndrias íntegras (Figura 25 A, B e C, página 147). Os osteócitos situados no interior da matriz óssea não apresentaram alterações ultraestruturais quando comparados aos dos demais grupos (Figura 26 E e F, página 148). Na região próxima ao osso alveolar foram encontrados macrófagos ativos (Figura 25 D, página 147). Essas células de formato irregular eram volumosas e possuíam

numerosas e bem desenvolvidas organelas citoplasmáticas (Figura 25 F, página 147). O complexo de Golgi era abundante, demonstrando características de plena atividade com membranas expandidas, dilatação das cisternas e vesículas circulantes de diversos tamanhos. Os lisossomos eram numerosos e variavam em tamanho, forma e densidade (Figura 25 E, página 147). Retículos endoplasmáticos do tipo rugoso e liso, bem desenvolvidos, também foram identificados. As mitocôndrias eram grandes e numerosas. A superfície dessa célula era moldada com numerosas pregas e projeções digitiformes, o que revela atividade de fagocitose.

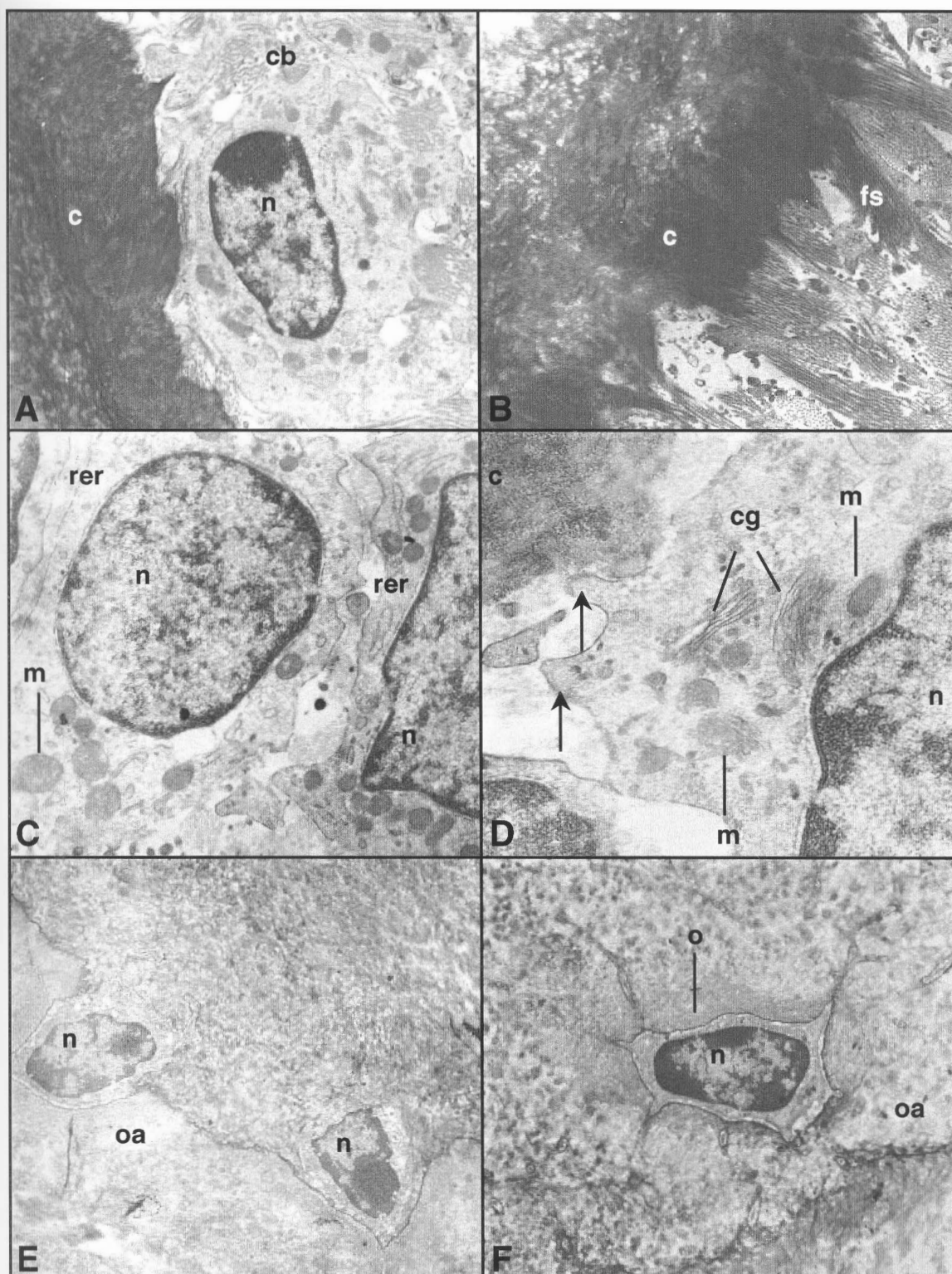


Figura 17 Eletromicrografias (MET) do grupo **controle**. **A)** cementoblasto, 7000X; **B)** fibras de Sharpey (**fs**) embebidas no cimento (**c**), 20000X; **C)** proximidade entre cementoblastos (**cb**), 7000X; **D)** processos citoplasmáticos do cementoblasto (seta), 20000X; **E)** aprisionamento de osteoblastos, 3000X; **F)** osteócito, 3000X. **n** - núcleo; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **cg** - complexo de Golgi; **o** - osteócito; **m** - mitocôndria; **oa** - osso alveolar.

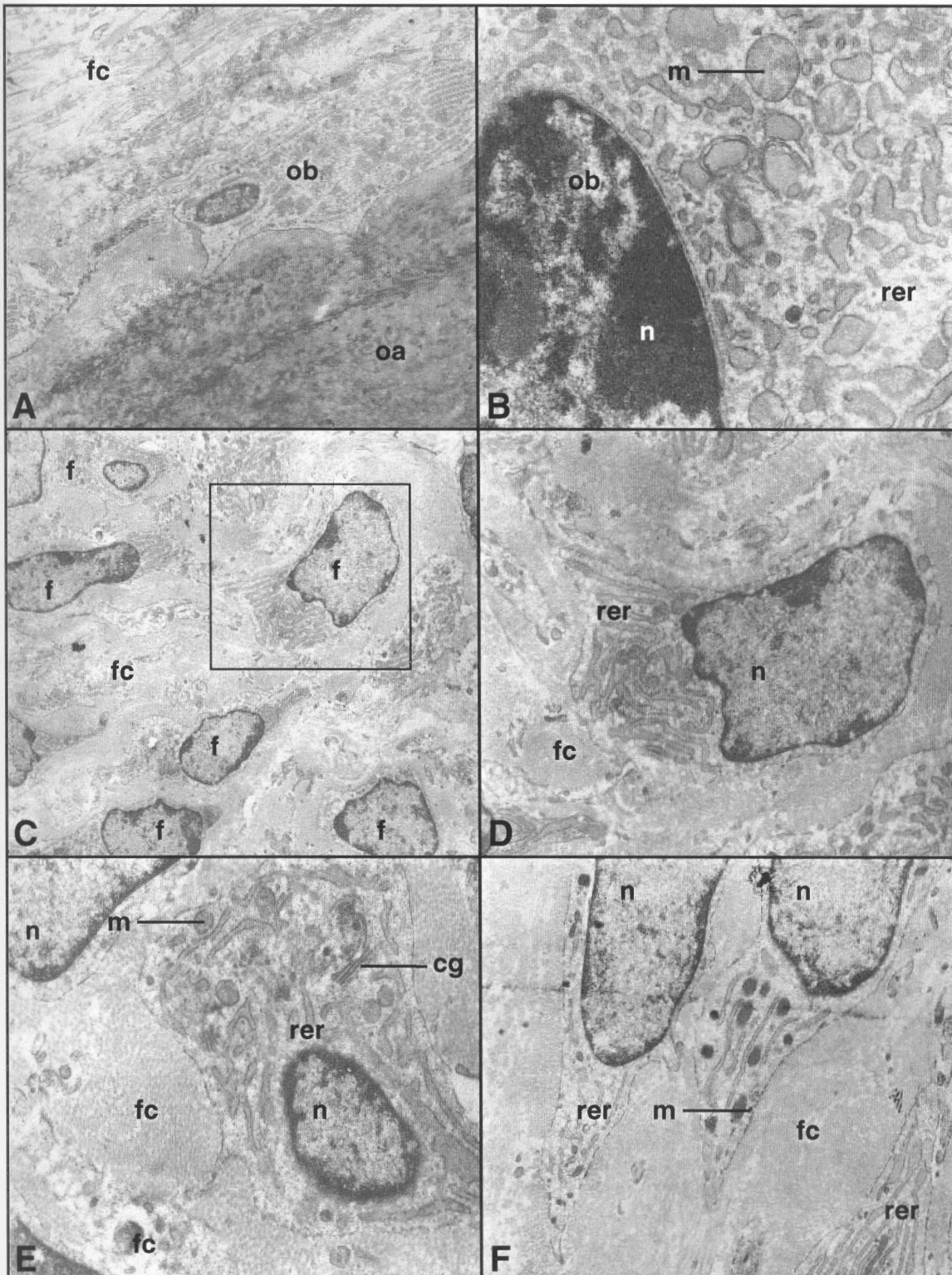


Figura 18 Eletromicrografias (MET) referentes ao grupo **controle**. **A)** osteoblasto (**ob**) junto à superfície óssea, 3000X; **B)** osteoblasto em detalhe, 12000X; **C)** fibroblastos na região central do LPD, 3000X; **D)** C em maior aumento, 7000X; **E)** fibroblasto com núcleo polarizado (**f**), 12000X; **F)** porções de dois fibroblastos adjacentes, 7000X. **n** - núcleo; **cg** - complexo de Golgi; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **m** - mitocôndria; **fc** - fibras colágenas; **oa** - osso alveolar; **f** - fibroblasto.

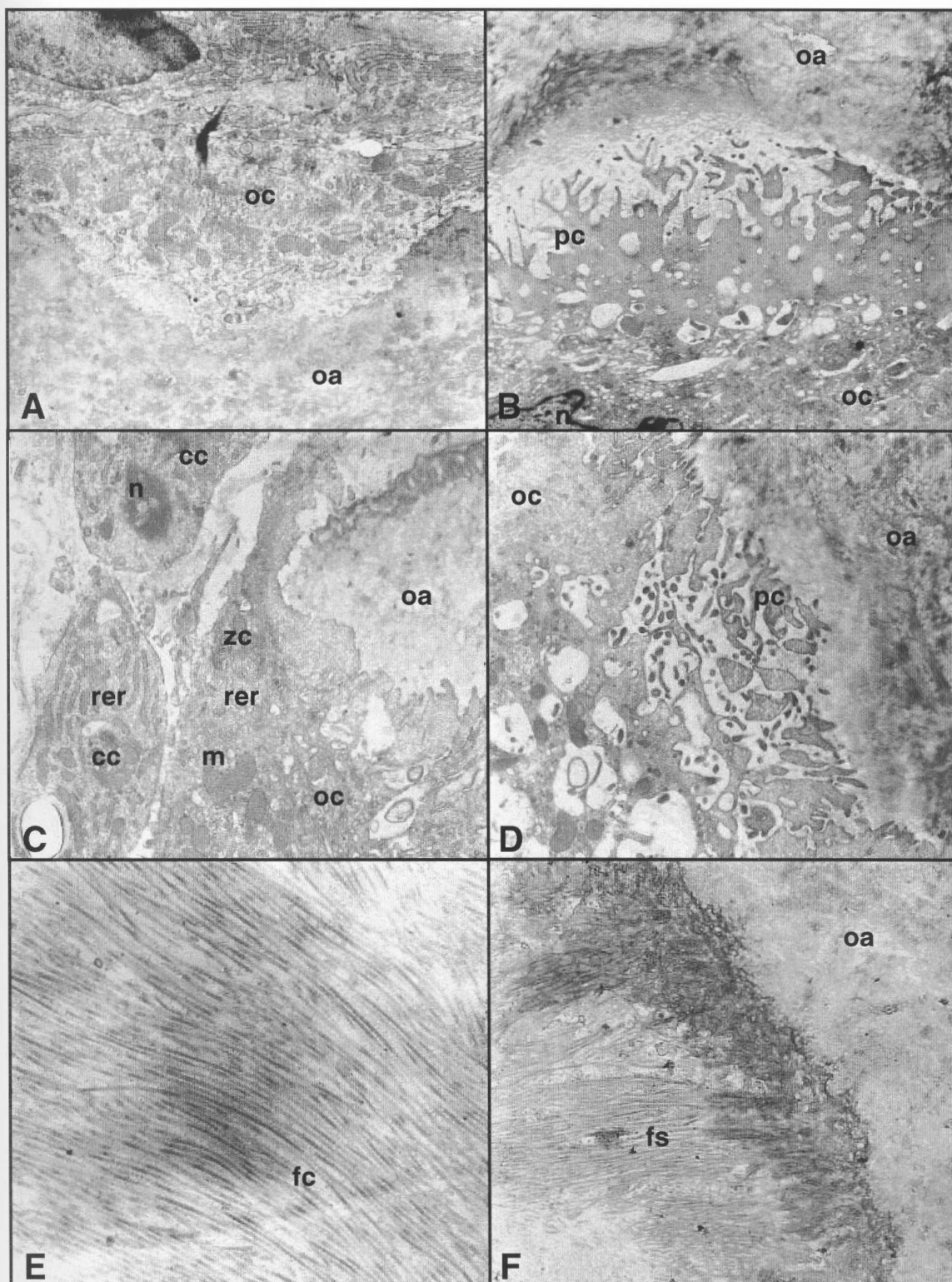


Figura 19 Eletromicrografias (MET) referentes ao grupo **controle**. **A)** osteoclasto quiescente, 7000X; **B)** osteoclasto ativo, 7000X; **C)** células companheiras (**cc**), 7000X; **D)** borda em escova, 7000X; **E)** fibras colágenas (**fc**) na região central do LPD, 12000X; **F)** fibras de Sharpey (**fs**), 7000X. **n** - núcleo; **oc** - osteoclasto; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **pc** - processo citoplas-mático; **f** - fibroblasto; **m** - mitocôndria; **zc** - zona clara; **oa** - osso alveolar.

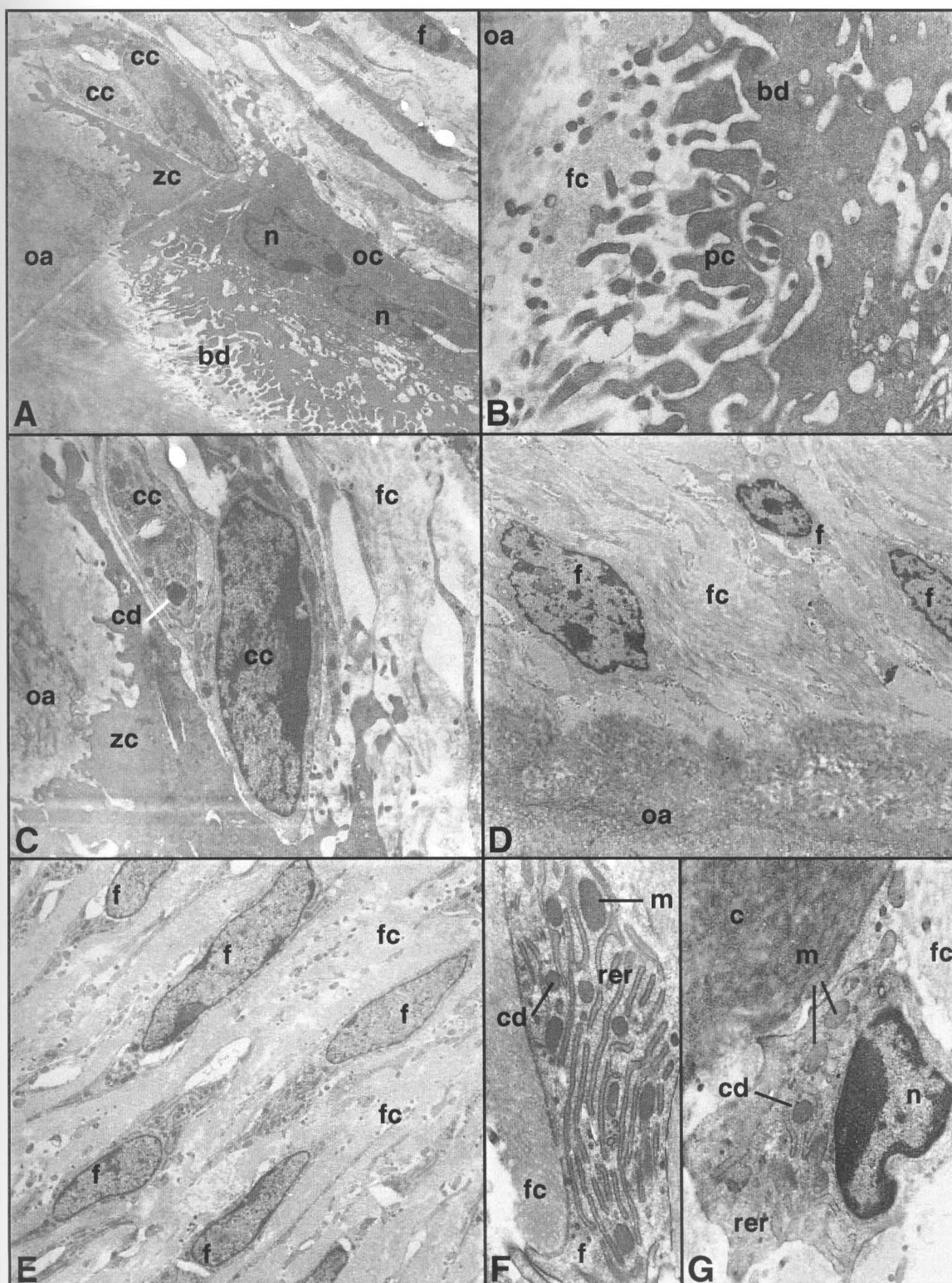


Figura 20 Eletromicrografias (MET) do grupo **placebo**. Lado de pressão: **A)** osteoclasto ativo, 3000X; **B)** borda em escova (**bd**), 12000X; **C)** célula companheira, 7000X; **D)** e **E)** fibroblastos, 3000X; **F)** maior aumento de E, 7000X; **G)** cementoblasto; 7000X. **n** - núcleo; **c** - cemento; **m** - mitocôndria; **fc** - fibras colágenas; **f** - fibroblasto; **oc** - osteoclasto; **pc** - prolongamento citoplasmático; **cc** - célula companheira; **cd** - corpo denso; **rer**; - retículo endoplasmático rugoso; **oa** - osso alveolar; **zc** - zona clara.

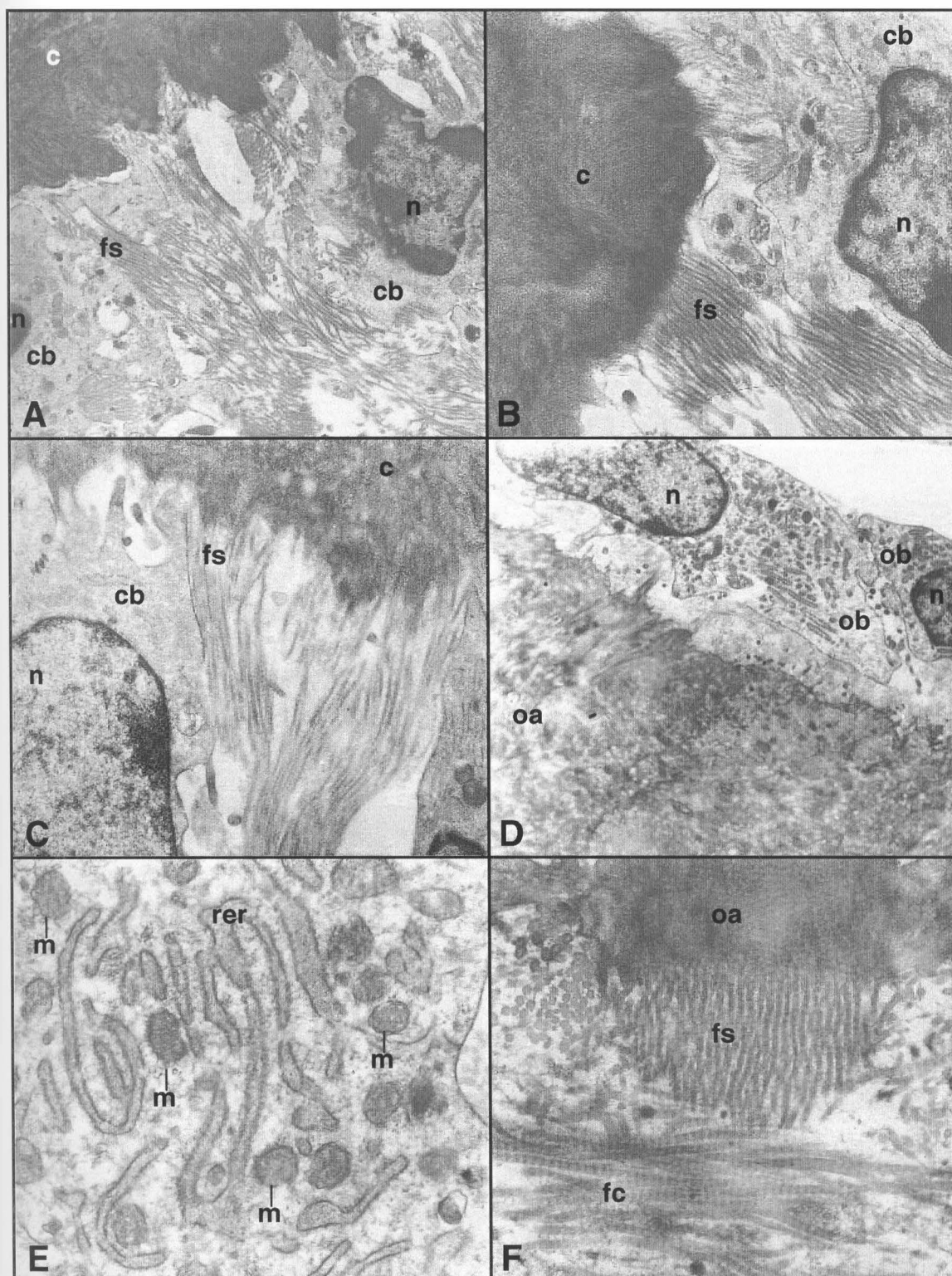


Figura 21 Eletromicrografias (MET) do grupo **placebo**. Lado de tração: **A)** cemento-blastos em íntima relação com o cimento, 7000X; **B)** e **C)** fibras de Sharpey embebidas no cimento, 12000X; **D)** osteoblastos ativos, 7000X; **E)** maior aumento de D, 12000X; **F)** fibras de Sharpey embebidas na matriz óssea, 20000X. **n** - núcleo; **ob** - osteoblasto; **cb** - cementoblasto; **fc** - fibras colágenas; **fs** - fibras de Sharpey; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **m** - mitocôndria; **c** - cimento; **oa** - osso alveolar.

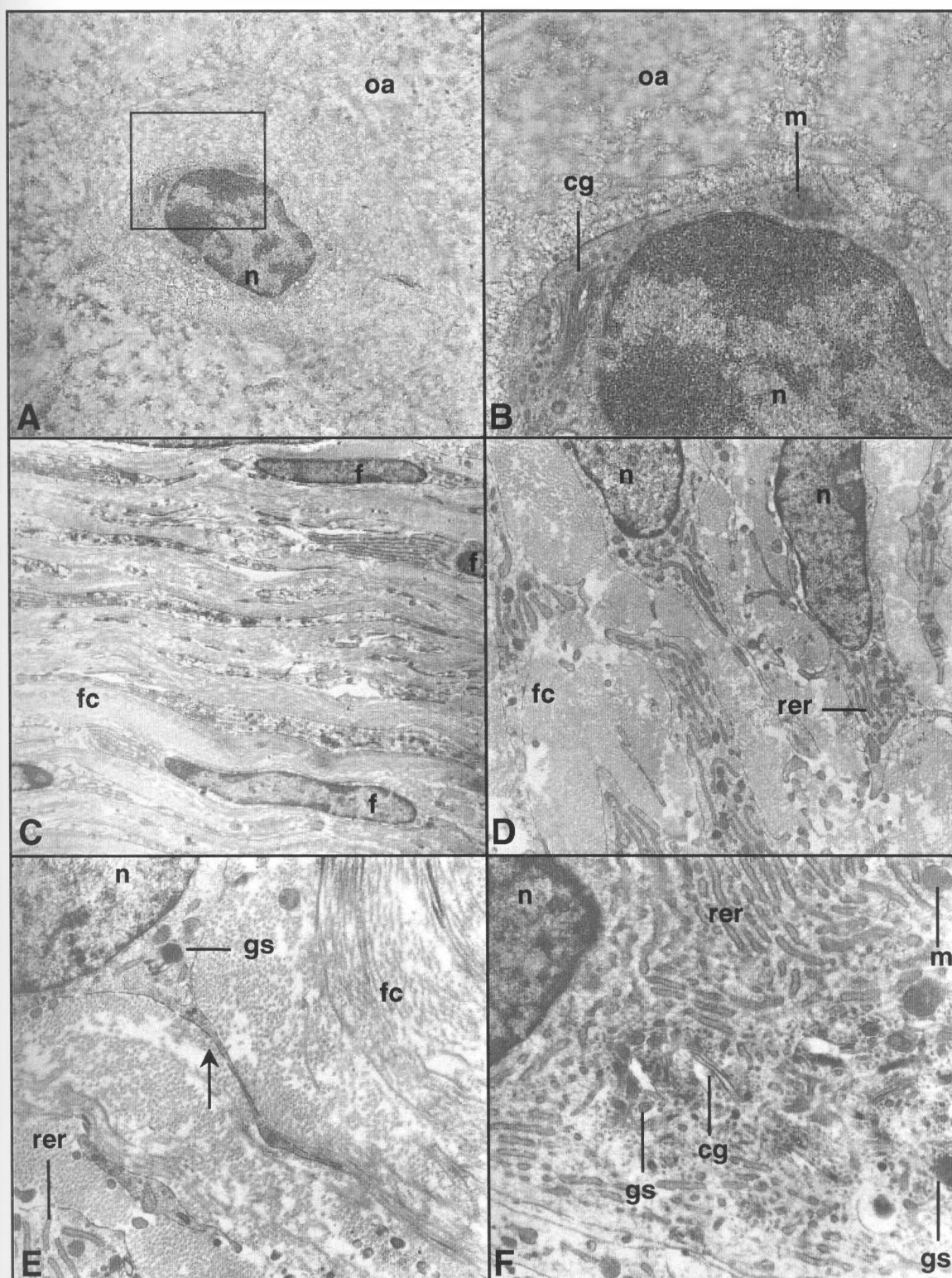


Figura 22 Eletromicrografias (MET) do grupo **placebo**. Lado de tração: **A)** osteócito, 3000X; **B)** maior aumento de A, 12000X; **C)** fibroblastos (f) distendidos, 3000X; **D)** fibroblastos com extensos **rer** revelam intensa atividade secretora, 7000X; **E)** processo citoplasmático do fibroblasto (seta), 12000X; **F)** volumosos complexos de Golgi do fibroblasto, 12000X. **n** - núcleo; **fc** - fibras colágenas; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **m** - mitocôndria; **gs** - grânulo de secreção; **cg** - complexo de Golgi; **oa** - osso alveolar.

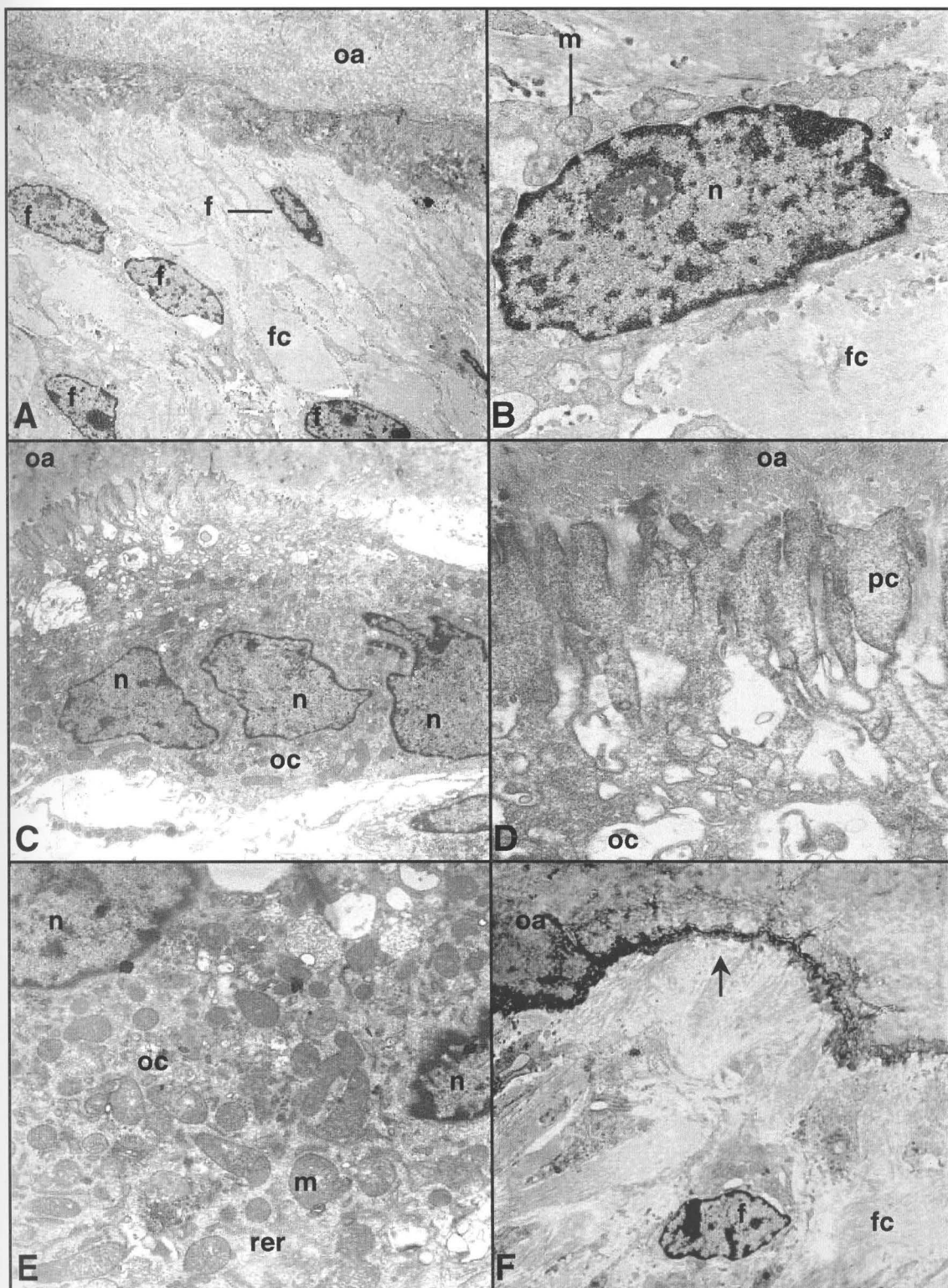


Figura 23 Eletromicrografias (MET) do grupo **experimental**. Lado de pressão: **A)** fibroblastos, 3000X; **B)** A em detalhe, 7000X; **C)** osteoclasto, 7000X; **D)** borda em escova, 12000X; **E)** mitocôndrias perinucleares, 12000X; **F)** lacuna de Howship (seta), 3000X. **n** - núcleo; **f** - fibroblasto; **fc** - fibras colágenas; **oc** - osteoclasto; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **m** - mitocôndria; **pc** - prolongamento citoplasmático; **oa** - osso alveolar.

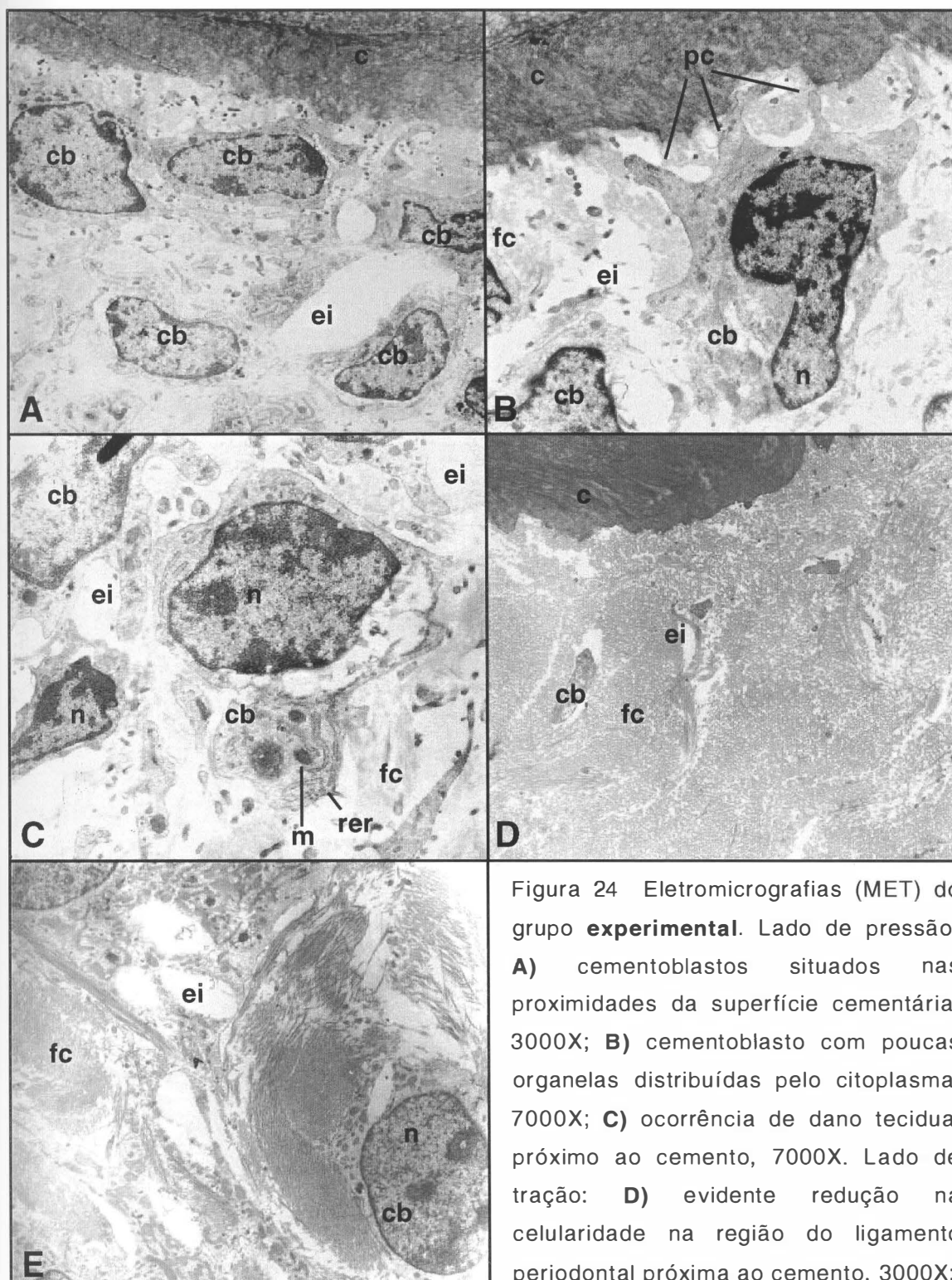


Figura 24 Eletromicrografias (MET) do grupo **experimental**. Lado de pressão: **A)** cementoblastos situados nas proximidades da superfície cementária, 3000X; **B)** cementoblasto com poucas organelas distribuídas pelo citoplasma, 7000X; **C)** ocorrência de dano tecidual próximo ao cimento, 7000X. Lado de tração: **D)** evidente redução na celularidade na região do ligamento periodontal próxima ao cimento, 3000X;

E) espaços claros entre as fibras colágenas e danos celulares, presentes próximo à superfície cementária, 7000X. **n** - núcleo; **c** - cimento; **cb** - cementoblasto; **fc** - fibras colágenas; **ei** - espaço intercelular; **pc** - prolongamento citoplasmático; **m** - mitocôndria; **rer** - retículo endoplasmático rugoso.

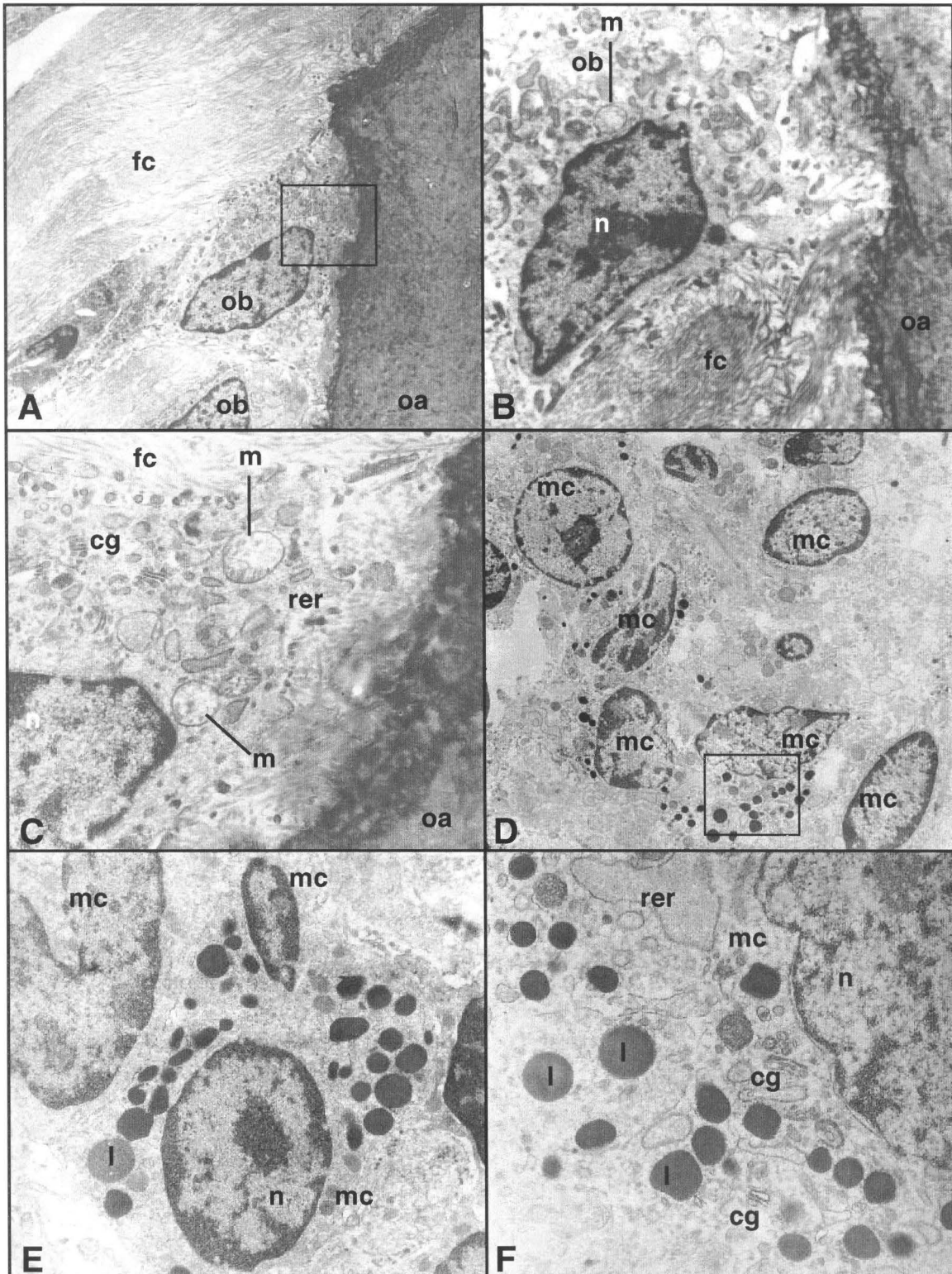


Figura 25 Eletromicrografias do grupo **experimental**. Lado de tração: **A)** osteoblasto junto ao osso, 3000X; **B)** osteoblasto próximo à superfície óssea, 7000X; **C)** A em maior aumento, 12000X; **D)** macrófagos ativos, 12000X; **E)** macrófago com numerosos lisossomos, 7000X; **F)** D em maior aumento, 12000X. **n** - núcleo; **ob** - osteoblasto; **fc** - fibras colágenas; **l** - lisossomo; **mc** - macrófago; **m** - mitocôndria; **rer** - retículo endoplasmático rugoso; **cg** - complexo de Golgi; **oa** - osso alveolar.

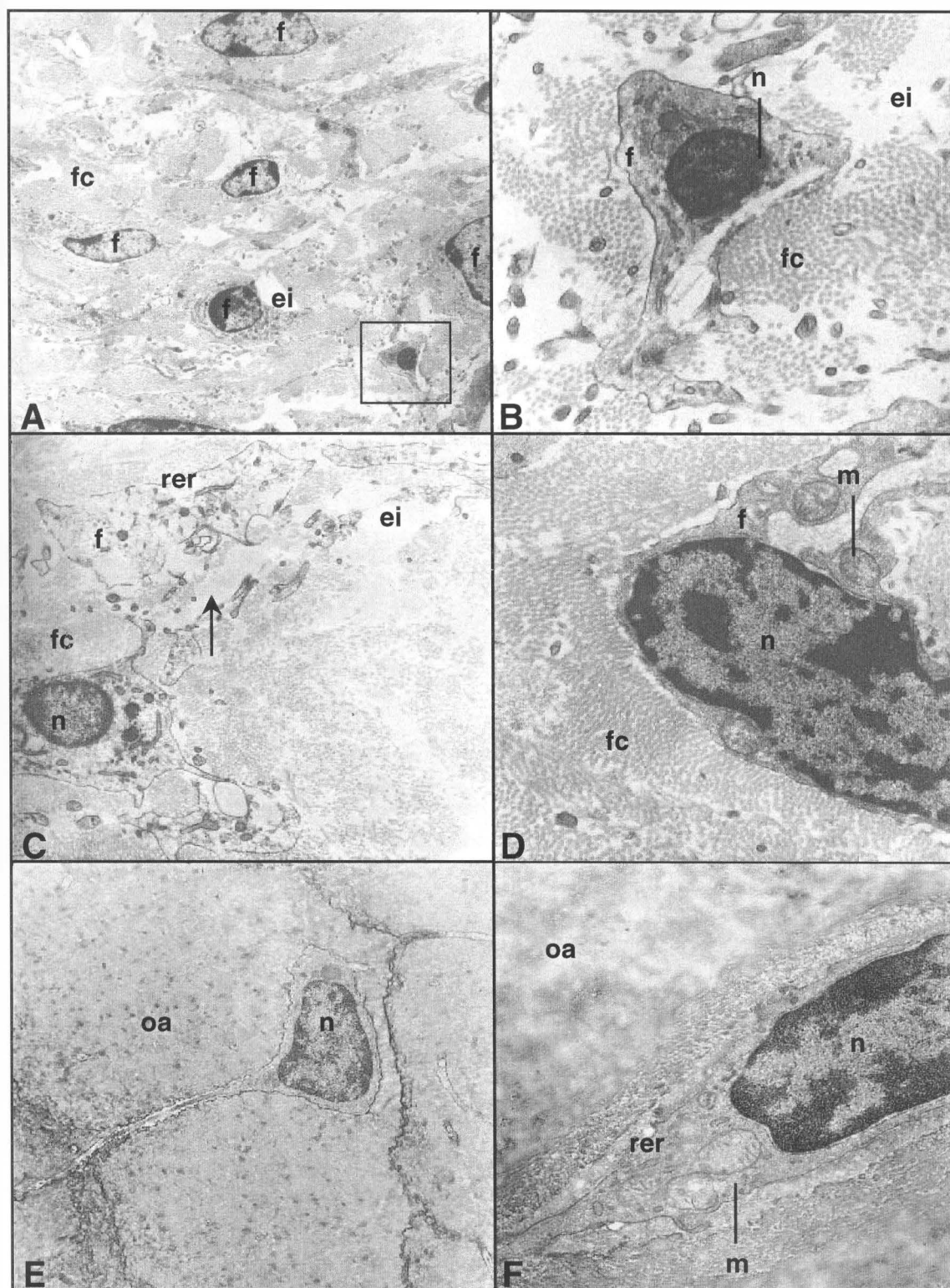


Figura 26 Eletromicrografias (MET) do grupo **experimental**. Lado de tração: **A)** presença de espaços intercelulares (**ei**) indicando edema, 3000X; **B)** maior aumento de A, 7000X; **C)** dano celular (seta), 7000X; **D)** alargamento e distorção mitocondrial, 12000X; **E)** osteócito, 3000X; **F)** osteócito em maior aumento, 12000X. **n** - núcleo; **f** - fibroblasto; **oa** - osso alveolar; **fc** - fibras colágenas; **m** - mitocôndria; **rer** - retículo endoplasmático rugoso.

6 DISCUSSÃO

As reações teciduais que ocorrem no movimento dentário ortodôntico resultam de mudanças geradas na distribuição da tração e da pressão sobre o periodonto a partir da aplicação da força ortodôntica, dependendo do estado biológico deste tecido.

Fatores locais relacionados aos dentes e à oclusão influenciam a estrutura alveolar e o próprio remodelamento ósseo (SANDY, FARNDAL e MEIKLE, 1993; LINDHE, KARRING e LANG, 1999). Por outro lado, pacientes que requerem tratamento ortodôntico também podem apresentar variações do metabolismo ósseo normal devido a doenças sistêmicas ou como resultado de modulação farmacológica, afetando não só a qualidade como a quantidade do movimento dentário (MIDGETT, SHAYE e FRUGE, 1981; COLLINS e SINCLAIR, 1988; ROBERTS, 1996). O fato de ser, o diazepam, medicamento amplamente utilizado como droga ansiolítica e anticonvulsivante, além da falta de trabalhos sobre sua influência no remodelamento dos tecidos

periodontais durante a movimentação dentária ortodôntica, motivaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

O modelo experimental utilizado foi a cobaia, da espécie *Cavia porcellus*, animal utilizado em grande número de trabalhos experimentais relacionados à Farmacologia e Ortodontia (LITTON, 1974; LEFORT e VARGAFTIG, 1978; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). A organização dos tecidos do periodonto desses animais, bastante semelhante a dos seres humanos, facilita a associação entre os resultados obtidos e possibilita a visualização das reações tissulares no processo alveolar como um todo através da ML. O tamanho reduzido da largura periodontal das cobaias também permite o estudo detalhado do osso alveolar, ligamento periodontal e superfície radicular no microscópio eletrônico de transmissão (LITTON, 1974; RYGH, 1977; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). De acordo com REITAN e RYGH (1994) todas as experiências de curta duração com animais são totalmente comparáveis com as feitas em seres humanos. Nas experiências de longa duração com animais é necessária a comparação cuidadosa com o osso das áreas de controle.

De modo semelhante aos seres humanos, as cobaias são animais naturalmente deficientes da enzima L-gluconolactona-oxidase, responsável pela última etapa da conversão da D-glucose em ácido ascórbico. Assim, fez-se necessária a suplementação dietética com vitamina C, para evitar o aparecimento de sinais e sintomas típicos do escorbuto (LITTON, 1974; OGAWARA, AOKI, OKIJI *et al.*, 1997).

O cálculo para a administração do diazepam foi feito de modo a se obter a produção de sedação, sem efeitos adversos no comportamento ou saúde geral do animal (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984).

A força aplicada para promover a separação dos incisivos superiores das cobaias foi de 25g, considerada força ideal e capaz de induzir ao rompimento tecidual de maneira ordenada e a remodelação óssea e do ligamento periodontal nesses animais (STOREY, 1955; BOTTING e STOREY, 1973; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). A diferença na reação tecidual das estruturas de suporte dentário sob a aplicação de forças leves e pesadas foi tema de diversos estudos, com várias evidências na literatura favorecendo e contradizendo cada ponto de vista (STOREY e SMITH, 1952; UTLEY, 1968; BOTTING e STOREY, 1973; REITAN e RYGH, 1996). Nesse trabalho, a absorção óssea encontrada foi do tipo frontal, sendo compatível com os trabalhos que relacionam o tipo de remodelamento ósseo com a quantidade de força e a manutenção da vascularidade do ligamento (MACAPANPAN, WEINMANN e BRODIE, 1954, GIANELLY, 1969).

A aplicação de força ideal tem correlação direta com as propriedades elásticas da liga e fios usados em Ortodontia, assim como seu diâmetro e comprimento (WATERS, HOUSTON e STEPHENS, 1981). A escolha da liga TMA para a confecção do dispositivo utilizado fundamentou-se no princípio físico de que os fios ortodônticos com baixo nível de tensão/deformação liberam forças mais constantes, devido à menor alteração da força gerada em função da deformação (BURSTONE

e GOLDBERG, 1980; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996). A incorporação do helicóide e o comprimento da haste dos dispositivos usados nesse experimento permitiram o aumento do comprimento do fio e a redução da força para nível fisiologicamente aceitável para a espécie (BOTTING e STOREY, 1973; WATERS, HOUSTON e STEPHENS, 1981; KEHOE, COHEN, ZARRINIA *et al.*, 1996).

Sabe-se que quando a força ortodôntica é aplicada ao dente, o osso alveolar no lado de pressão sofre ciclos sucessivos de absorção e formação óssea, enquanto no lado de tração há predomínio da deposição óssea (TYER, GIANELLY e RUBENS, 1968; RYGH, 1972, 1973; KING e THIEMS, 1979; LILJA, LINDSKOG e HAMMARSTRÖM, 1983; SHANFELD, JONES, LASTER, *et al.*, 1986; SCHEIJMANS, DIEUDONNÉ, ANDERSEN *et al.*, 1996). Provavelmente, existem múltiplos caminhos para a ativação das células associadas aos tecidos periodontais, seja através da resposta inflamatória, ou pela deformação mecânica das células, ou ainda como resultado dos potenciais elétricos gerados pelo estresse mecânico do osso (efeito piezoelétrico) (DAVIDOVITCH, FINKELSON, STEIGMAN *et al.*, 1980; ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; McDONALD, 1983; DAVIDOVITCH, NICOLAY, NGAN, *et al.*, 1988; McDONALD, 1993). De qualquer modo, o estímulo mecânico age como gatilho de ativação celular que resulta no remodelamento ósseo, a partir das alterações bioquímicas geradas no ambiente intracelular, indicativas de mudança nas taxas de proliferação, diferenciação e síntese (HARTER, HRUSKA e DUCAN, 1995).

Vários trabalhos relacionam o AMPc como mediador da resposta biológica nos processos inflamatórios, incluindo a quimiotaxia de macrófagos com liberação de collagenases e o estímulo à absorção óssea (DAVIDOVITCH e SHANFELD, 1975; RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975). Segundo YAMASAKI (1983), o movimento dentário ortodôntico seria desencadeado pela perturbação mecânica dos tecidos periodontais, levando ao aumento na concentração de mediadores químicos, entre os quais, o AMPc, agiria como modulador da atividade osteoclástica culminando com a absorção óssea e o movimento do dente.

O aumento dos níveis de AMPc no osso alveolar de gatos submetidos à movimentação ortodôntica, também sugere sua atuação como elemento intermediário ao estímulo mecânico aplicado, tal como ocorre na ação de hormônios e drogas (SUTHERLAND e RALL, 1960; KLEIN e RAISZ, 1971; DAVIDOVITCH, FINKELSON e STEIGMAN, 1980). DAVIDOVITCH e colaboradores (1980) demonstraram que os níveis de AMPc estão aumentados em áreas de absorção óssea durante o movimento ortodôntico, indicando sua correlação com a atividade celular. Na busca sobre o papel dos nucleotídeos cíclicos na indução da absorção óssea durante o movimento dentário, YAMASAKI (1983) utilizou tanto inibidores (teofilina) como ativadores (imidazol) da enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação do AMPc, e concluiu que a administração da teofilina aumenta o número de osteoclastos junto à superfície óssea enquanto o imidazol inibe o aparecimento dessas células.

Como durante o movimento dentário ortodôntico há um aumento dos níveis de AMPc no ligamento periodontal e o diazepam é um potente inibidor da fosfodiesterase, poder-se-ia esperar que o aumento da concentração intracelular desse nucleotídeo influenciasse a taxa de absorção óssea e, conseqüentemente, do movimento dentário.

Os dados obtidos pelo registro da separação entre os incisivos superiores das cobaias revelaram diferença estatística significativa nas médias entre grupos testados. O grupo **experimental** apresentou considerável quantidade de separação dentária ($2,38 \pm 0,12\text{mm}$) quando comparado ao grupo **placebo** ($1,28 \pm 0,11\text{mm}$), indicando que no grupo submetido à administração de diazepam a extensão do movimento dentário foi 70% maior. ($p < 0,05$) (Figura 27, página 154). De fato, evidência de que a administração de diazepam aumenta o movimento dentário também foi relatada por BURROW e colaboradores (1986), embora o fato não tenha sido creditado à alteração nos níveis do AMPc.



Figura 27 Fotografias do 14º dia de experimento mostrando a separação dentária:

A) grupo **placebo**; **B)** grupo **experimental**.

Esses dados demonstram que o recrutamento e a atividade das células ósseas estão sujeitos a ação de fatores locais e sistêmicos, sendo que o delicado equilíbrio entre a formação e a absorção óssea pode ser rompido por agentes farmacológicos rotineiramente utilizados na Medicina para o tratamento das mais diversas patologias, com possíveis efeitos sobre o movimento dentário, no caso de pacientes em tratamento ortodôntico (RODAN e MARTIN, 1981; MARKS e POPOFF, 1988; AUBIN, 1989; BURR e MARTIN, 1989; SANDY, FARNDAL e MEIKLE, 1993; SODEK e McKEE, 2000).

Os vários estágios de diferenciação dos osteoclastos refletem sua morfologia, assim como sua atividade (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986). Neste processo, a concentração intracelular de íons Ca^{2+} e de AMPc é fundamental (KLEIN e RAISZ, 1971; RODAN e RODAN, 1974; RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975; YAMASAKI, 1983). Os osteoclastos seguem trajeto específico a partir da medula óssea, passando para a circulação sangüínea e ao 3º dia, após a ativação inicial do aparelho ortodôntico, osteoclastos ativos já podem ser identificados junto à superfície óssea adjacente ao ligamento periodontal, sendo indicativo de atividade absorptiva a presença da borda em escova e de vesículas citoplasmáticas de tamanhos variados no espaço da lacuna de Howship (HUGHES e KING, 1998; KING, ARCHER e ZHOU, 1998). Após o período de absorção há o predomínio da fase de reparo quando então os osteoclastos não são mais encontrados nas lacunas de Howship, sendo substituídos por células mononucleares (TSAY, CHEN e OYEN, 1999). A existência de

osteoclastos mononucleares tem sido descrita por diversos pesquisadores (DUDLEY e SPIRO, 1961; NIJWIEDE, BURGER e FEYEN, 1986, DOMON e WAKITA, 1991), sendo caracterizados como células inativas resultantes da desintegração de osteoclastos multinucleares, desconhecendo-se, entretanto, sua capacidade de iniciar novo ciclo de atividade pela fusão, após estímulo apropriado, ou sofrerem completa degeneração. No grupo **controle**, observou-se presença de poucos osteoclastos ativos e quiescentes junto à cortical interna do osso alveolar caracterizando atividade de remodelamento ósseo. Osteoclastos do grupo **placebo** encontrados no lado de pressão eram numerosos, maiores e apresentavam bordas em escova mais desenvolvidas, em comparação ao grupo **controle**, caracterizando o aumento da atividade dessas células.

O estímulo à formação dos osteoclastos pelo acúmulo intracelular de AMPc pôde ser aferida indiretamente no grupo **experimental**. Essas células já podiam ser identificadas em abundância já ao 3^o dia, se comparado ao grupo **placebo**. Além disso, a diferença mais marcante no grupo **experimental** era o grande avanço da frente de absorção sobre a superfície óssea que se manteve durante todo o período do experimento, evidenciada pela maior largura do ligamento no lado de pressão nesse grupo. A fase de reparo do ligamento periodontal foi nitidamente prejudicada nesses animais. Ao se comparar os cortes histológicos do 14^o dia, pôde-se observar que no grupo **placebo**, não havia osteoclastos no lado de pressão, como esperado, predominando a fase de reparo do ligamento e osso alveolar (KING, KEELING e

WRONSKI, 1991). No grupo **experimental**, embora áreas ativas de absorção já não fossem vistas, a atividade celular osteogênica para reparo da superfície ainda estava lenta, fato que pode estar relacionado à capacidade do diazepam em afetar quantitativamente e qualitativamente a atividade osteoblástica.

Após a aplicação de força ortodôntica no periodonto há tendência dos tecidos conjuntivos se remodelarem a fim de se obter o equilíbrio entre proliferação celular, migração, diferenciação, síntese e degradação de matriz, constituindo mecanismo adaptativo inerente ao processo de remodelamento. A ML revelou mudanças na disposição das fibras periodontais durante o movimento dentário ortodôntico. No 3º e 7º dia, no lado de tração do grupo **placebo**, as fibras colágenas mantinham-se estiradas, adaptando-se ao progressivo aumento da distância entre o osso alveolar e o cimento. A regeneração das fibras vista a partir do 14º dia foi alcançada pela proliferação de fibroblastos e pela formação de novas fibras, com espículas ósseas sendo largamente depositadas pelos osteoblastos na superfície alveolar seguindo a direção das fibras distendidas. Isso confirma a relação existente entre a densidade de osteoblastos presentes sobre a superfície óssea e velocidade da histogênese (MUNDY, 1999).

Por outro lado, a administração de diazepam provocou profundas alterações no aspecto morfológico e na organização tecidual do periodonto. Nesse grupo houve diminuição da densidade celular do ligamento periodontal em todos os dias de observação. No lado de tração da superfície óssea alveolar havia grande desarranjo da

organização fibrilar, com destruição da própria morfologia das fibras colágenas e retardo na reconstituição da integridade do ligamento, tanto no 3º como no 7º dia. A osteogênese ainda não havia progredido substancialmente sobre a superfície alveolar ao 14º dia de observação, refletindo-se na manutenção da extensa largura do espaço do ligamento periodontal.

A intensa vasodilatação observada nos animais do grupo **experimental** na ML demonstrou, indiretamente, a interrelação entre o AMPc e a ação das prostaglandinas (SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.*, 1980; SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986). Essas substâncias são potentes vasodilatadores, tanto em humanos como em cobaias (HAMBERG e SAMUELSSON, 1972), e seu mecanismo de transdução envolve especificamente a atividade da adenilciclase e o aumento dos níveis de AMPc (PICKLES, 1967; SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.*, 1980; INSEL, 1996).

Fatores hormonais, como estrógenos, PTH, metabólitos da vitamina D, além de fatores produzidos localmente como citocinas, reguladores do crescimento celular e prostaglandinas podem agir tanto na atividade, quanto na quantidade de células ósseas (NIJWEIDE, BURGER e FEYEN, 1986). Essas substâncias modificam a capacidade absorptiva dos osteoclastos, aumentando ou diminuindo-a através de alterações transitórias ou permanentes na morfologia da célula, em suas organelas intracelulares (AUBIN, 1989). As presenças da borda em escova e da zona clara estão entre as características mais marcantes dos osteoclastos (SCOTT e PEASE, 1956; DUDLEY e SPIRO,

1961; KALLIO, GARANT e MINKIN, *et al.*, 1972; KING e HOLTROP, 1975; DOMON e WAKITA, 1991), e embora a ML não permita a demonstração conclusiva dessas estruturas (DOMON e WAKITA, 1991), esta dificuldade é suprida pela MET, permitindo assim a visualização das alterações provocadas pelos hormônios osteotrópicos e por outras substâncias químicas (GONZALES e KARNOVSKY, 1961; DUDLEY e SPIRO, 1961; HANCOX e BOOTHROYD, 1961; EVERTS, DELAISSÉ, KORPER *et al.*, 1992).

Embora o mecanismo de ação do PTH e da calcitonina sobre o tecido ósseo seja mediado pelo aumento na concentração do AMPc, os efeitos produzidos são radicalmente antagônicos (SMITH e JOHNSTON, 1975). HOLTROP e colaboradores (1974) avaliaram os efeitos ultraestruturais nos osteoclastos de substâncias como o PTH, calcitonina e colchicina, dando especial atenção às áreas como a zona clara e a borda em escova. Esses autores concluíram que o efeito morfológico do PTH sobre os osteoclastos caracteriza-se pelo grande aumento da borda em escova. Nos animais sem interferência do PTH a borda em escova representava cerca de 11% do tamanho total do osteoclasto, enquanto que no grupo experimental essa proporção aumentou para 64% e as bordas em escova apresentavam maior largura e profundidade. Devido à intermitente capacidade dos osteoclastos de se movimentar pela superfície óssea, as células induzidas pelo PTH atuam em múltiplos episódios de absorção óssea, aumentando o número de lacunas (KLEIN e RAISZ, 1970; MCSHEEHY e CHAMBERS, 1986). Por outro lado, a administração tanto de colchicina, como de calcitonina,

reduz o número de osteoclastos com bordas em escova e estas, quando presentes, apresentavam poucas e delgadas projeções citoplasmáticas. Acredita-se que ocorra diminuição da frequência da borda em escova e aumento da zona clara, pela conversão de boa parte da borda em escova em zona clara (HOLTROP, RAISZ e SIMMONS, 1974). KALLIO e colaboradores (1972) afirmaram que a calcitonina é responsável pela ausência de borda em escova em osteoclastos tratados com esse hormônio hipocalcêmico.

Os bisfosfonados, conhecidos como potentes inibidores da absorção óssea, também produzem alterações morfológicas características no citoesqueleto dos osteoclastos, reduzindo o tamanho e a presença da borda em escova (MILLER e JEE, 1979).

Nesta pesquisa, os resultados obtidos através da análise da MET, revelaram que o diazepam promoveu efeito direto na estrutura e tamanho das células. Os osteoclastos apresentaram aumento na largura e profundidade dos prolongamentos citoplasmáticos da borda em escova, com organelas bem desenvolvidas e em grande atividade. Estas observações suportam a hipótese de que o diazepam interfere na atividade osteoclástica, acelerando-a, mediante a modificações na morfologia e estrutura intracelular. As lacunas de Howship livres de osteoclastos, porém vizinhas às lacunas ocupadas corrobora com os relatos sobre a capacidade de movimentação dessas células sobre a superfície óssea (McSHEEHY e CHAMBERS, 1986).

No lado de tração do grupo **experimental** foram identificados vários graus de destruição tecidual na estrutura do periodonto, tais como

acentuada vasodilatação, danos celulares, alterações na morfologia das fibras colágenas e infiltrado macrofágico. As alterações nas organelas dos osteoblastos incluem mitocôndrias dilatadas, com pouca densidade e distorcidas, além do desaparecimento das cristas mitocondriais, alargamento de sacos endoplasmáticos em algumas células, o que prejudica a atividade sintética dessa célula. Esse quadro confirma a nítida diminuição na formação óssea observada na ML.

A presença de macrófagos sugere seu provável envolvimento com a substituição do colágeno (KING e THIEMS, 1979; BERTOLAMI e BRONSON, 1989). Vários trabalhos têm demonstrado que o AMPc está relacionado ao processo inflamatório e à destruição tecidual, o que inclui estímulo à atividade dos macrófagos e à absorção óssea. Os macrófagos são particularmente importantes no processo de reparo tecidual, pois são células que liberam collagenases para degradação das fibras colágenas danificadas, além de substâncias quimiotáticas que estimulam a proliferação de fibroblastos e a presença de células endoteliais (BERTOLAMI e BRONSON, 1989; SHEWEMI, SHAMMARY, ZAMEL *et al.*, 1996).

Apesar de não terem sido realizadas aferições quanto à mobilidade dentária é provável que a administração de diazepam nos pacientes com aparelhagem ortodôntica acentue o grau de mobilidade, devido ao excessivo alargamento do espaço periodontal sem correspondente formação óssea para reconstituir a largura do ligamento, fato evidenciados nos animais do grupo **experimental**.

A característica mais marcante observada no grupo **placebo** através da MET foi o alto nível de atividade das células do ligamento. Após três dias da aplicação da força, a análise ultraestrutural dos fibroblastos e osteoblastos presentes mostrou um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, sugerindo que o estímulo ortodôntico favorece a síntese de proteínas, mantendo-a em níveis elevados durante todo o movimento dentário.

As áreas claras no ligamento periodontal, já observadas no 3º dia através da MET, muito provavelmente estão associadas aos danos celulares observados, em graus variados, nos fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos.

Os fibroblastos constituem população de células multifuncionais envolvidas com o remodelamento do colágeno, fato diretamente relacionado com a capacidade do tecido conjuntivo periodontal de se adaptar às demandas funcionais dele requerida (CHO e GARANT, 2000). Vários estudos sugerem que osteoclastos, fibroblastos e macrófagos estão envolvidos na fagocitose do colágeno, onde grande quantidade de colágeno é absorvida em curto período de tempo pela ação da enzima collagenase (PARAKKAL, 1964; GARANT, 1976, BRUDVIK e RYGH, 1994 b). Entretanto, a rápida degradação do colágeno nos tecidos periodontais pode ter efeitos deletérios, pelo rompimento do tênue equilíbrio com atividade de síntese de novas moléculas (TEN CATE e DEPORTER, 1975). A deficiência de vitamina C e a doença periodontal demonstram claramente o desequilíbrio entre formação e degradação do colágeno, prejudicando inclusive a formação de osteóide (BOOTH e

UITTO, 1981; SODEK, 1989; MIYAJIMA, ITO, MATSUYAMA *et al.*, 1995; OGAWARA, AOKI, OKIJI *et al.*, 1997). As alterações ultraestruturais observadas nos fibroblastos do grupo **experimental** podem estar relacionadas à concentração de AMPc, pelo que de acordo com RODAN e colaboradores (1975), níveis elevados deste nucleotídeo inibem o crescimento e a atividade de fibroblastos *in vitro*.

Durante o movimento dentário, as fibras colágenas ficam alongadas e há formação óssea nas áreas de tração (HELLER e NANDA, 1979; BUMANN, CARVALHO, SCHWARZER *et al.*, 1997). DIAZ (1978) ressaltou que não há aumento do metabolismo do colágeno no ligamento periodontal dos dentes submetidos à movimentação ortodôntica, e sim o favorecimento à neoformação de fibras colágenas no lado de tração e de degradação no lado de pressão, através da redução da produção de colágeno.

Vários agentes farmacológicos podem alterar o metabolismo do colágeno sejam por agir diretamente na via de sua síntese ou por provocar danos às organelas intracelulares dos fibroblastos. Drogas como a colchicina que provocam a despolimerização dos microtúbulos e a ruptura da organização normal do complexo de Golgi, prejudicam a rede microtubular essencial para o transporte e exocitose normal de grânulos secretores de colágeno e para a manutenção de um relacionamento normal entre o Golgi e as outras organelas dos fibroblastos (CHO e GARANT, 1981; GARANT e CHO, 1989). A administração de latirógeno inibe a ligação entre as cadeias polipeptídicas da molécula do colágeno, causando rápida deterioração

das fibras colágenas do ligamento periodontal submetido a forças ortodônticas, com grande aumento da mobilidade dentária (HELLER e NANDA, 1979). Outras drogas como citocalasinas e colcemidas alteram drasticamente a atividade contrátil celular e a integridade citoesquelética, impedindo, por exemplo, a compactação, a orientação e o alinhamento das fibras colágenas com os fibroblastos, já a PGE_2 inibe a contratilidade do colágeno (AUBIN, 1989). Níveis aumentados de AMPc estimulam a degradação do colágeno em processos inflamatórios, num mecanismo associado a ação das prostaglandinas (RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975; KING e THIEMS, 1979; MARKLUND, LERNER, PERSSON *et al.*, 1994).

As observações histológicas realizadas nas cobaias que receberam diazepam revelaram desorganização na arquitetura e morfologia do ligamento periodontal pelo rompimento dos feixes de fibras colágenas e diminuição de sua síntese devido os danos causados nos fibroblastos. Estudos sobre cinética celular têm demonstrado aumento simultâneo da proliferação das células do ligamento periodontal e da resposta osteogênica (ROBERTS e JEE, 1974; ROBERTS, GOODWIN e HEINER, 1981; ROBERTS e CHASE, 1981), sendo que novos osteoblastos são formados localmente pela proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal semelhantes aos fibroblastos (MACAPANPAN, WEINMANN e BRODIE, 1954; YEE, 1979). A partir do estímulo ortodôntico, aproximadamente metade da população de fibroblastos do ligamento periodontal possui capacidade de diferenciação em células da linhagem osteogênica, enquanto o restante

não sofre recrutamento para tal fim (ROBERTS e FERGUNSON, 1989). Pode-se supor que os danos causados pelo diazepam nos fibroblastos podem ser, em parte, responsáveis pela reduzida formação óssea observada no grupo **experimental** (RODAN, BOURRET, HARVEY *et al.*, 1975).

Fato que merece atenção é que a resposta fisiológica ao movimento dentário ortodôntico pode aumentar tanto a absorção como a formação óssea (ROBERTS e FERGUSON, 1989). Considerando a existência de correlação entre o diazepam e o aumento da absorção óssea acelerada durante o movimento dentário ortodôntico, não se pode descartar a possibilidade de ocorrer perda óssea significativa durante a terapia ortodôntica em pacientes portadores de desordens do remodelamento ósseo e do colágeno.

Estudos histológicos têm demonstrado que o tratamento ortodôntico, ocasionalmente, induz à indesejável absorção radicular (RYGH, 1977, BARBER e SIMS, 1981, HARRY e SIMS, 1982), principalmente se associado à utilização de forças pesadas, responsáveis pela hialinização nas zonas de pressão (PHILLIPS, 1955; LANGFORD e SIMS, 1982; LILJA, LINDSKOG e HAMMARSTRÖM, 1983; BRUDVIK e RYGH, 1994 a; SISMANIDOU, HILLIGES e LINDSKOG, 1996). Além dos fatores mecânicos e biológicos conhecidos (KALEY e PHILLIPS, 1991; BREZNIAZ e WASSERSRTEIN, 1993 a, b), mediadores químicos como as prostaglandinas também podem contribuir para a absorção radicular. Os efeitos da administração exógena de PGE, principalmente a PGE₂, parecem contribuir para a absorção radicular,

havendo relação recíproca entre a síntese de PGE e a presença de AMPc (SOMJEN, BINDERMAN, BERGER *et al.*, 1980; YAMASAKI, SHIBATA, IMAI *et al.*, 1984; BRUDVIK e RYGH, 1991; BOEKENOOGEN, SINHA, NANDA *et al.*, 1996; MCNAB, BATTISTUTTA, TAVERNE *et al.*, 1999). A alteração sistêmica dos níveis de cálcio têm sido associada à absorção radicular induzida mecanicamente, indicando dependência do sistema endócrino (MIDGETT, SHAYE, e FRUGE, 1981; GOLDIE e KING, 1984).

O controle celular da absorção radicular não fisiológica é pouco conhecido, especialmente quando causado durante o movimento ortodôntico. A absorção radicular é semelhante à absorção óssea e envolve dois processos: a solubilização de minerais (que ocorre por acidificação) e pela degradação da matriz orgânica (DOMON, SHIMOKAWA, MATSUMOTO *et al.*, 1999).

No trabalho em questão, embora na ML e na MET não tenham sido detectadas lesões radiculares e a presença de odontoclastos, células morfológicamente semelhantes aos osteoclastos (SASAKI, MOTEGI, SUZUKI *et al.*, 1988), a MEV demonstrou alterações nas superfícies radiculares dos grupos **placebo** e **experimental** no lado de pressão. De fato, a utilização da ML e da MET para detecção de absorção radicular é limitada, pois as secções histológicas são realizadas em parte da raiz estudada, enquanto que a MEV permite o exame topográfico de toda superfície radicular (BOEKENOOGEN, SINHA, NANDA *et al.*, 1996).

As eletromicrografias de varredura do grupo **placebo** não demonstrou áreas de absorção radicular significantes, apenas algumas depressões de pouca profundidade, resultando da descalcificação cementária. O grupo **experimental** apresentou significativas alterações na superfície cementária e dentinária, porém com indícios de reparação mineral no 14º dia de experimento.

Os cementoblastos são responsáveis pela produção de cimento reparativo em alta velocidade (SISMANIDOU, HILLIGES e LINDSKOG, 1996) e sua indução ocorre a partir da população de células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento periodontal (RÓBERTS e FERGUSON, 1989). A redução da população de fibroblastos afeta adversamente o processo metabólico vital necessário para a reparação tecidual da superfície radicular (ZATZHENDLER e STEIGMAN, 1999). Os danos celulares aos cementoblastos identificados através da MET nos animais grupo **experimental** e a reduzida presença dessas células nas proximidades do cimento, nas áreas de tração, pode ter contribuído para absorções radiculares profundas encontradas neste grupo. A degradação da camada mais externa protetora do pré-cimento e das camadas formadoras de cementoblastos desencadeia a ação das células clásticas (BRUDVIK e RYGH, 1995; ZATZHENDLER e STEIGMAN, 1999).

É importante citar que pacientes tratados com drogas anticonvulsivantes mostram incidência maior na taxa de anormalidades radiculares, desde o encurtamento do comprimento radicular ao aumento na absorção das raízes, condições similares às observadas nos casos

de hipoparatiroidismo (ROBINSON, ROWE e HARRIS, 1978). Vários estudos têm demonstrado que o tratamento com drogas ansiolíticas e anticonvulsivantes tais com a difenil-hidantoína (Dilantin), a primidone (Misoline), a carbamazepina (Tegretol) e os fenobarbitúricos, pode provocar vários efeitos na atividade hormonal, incluindo a inibição da secreção do hormônio antidiurético, da calcitonina, da insulina e do PTH (PENTO, GLICK e KAGAN, 1973). A alteração no metabolismo ósseo e do cálcio que resulta em depleção dos níveis de cálcio sérico e em osteomalacia ou raquitismo é um dos efeitos colaterais mais marcantes na terapia com essa classe de fármacos. Isto se deve, provavelmente, ao metabolismo acelerado da vitamina D pela ação de enzimas hepáticas, fenômeno induzido pela própria droga anticonvulsivante (RICHENS e ROWE, 1970; LIVINGSTON, BERMAN e PAULI, 1973). É importante ressaltar que existe íntima relação entre a 1,25 DHCC e o AMPc, devido à influência desse metabólito sobre os níveis da proteína quinase AMPc-dependente (AUBIN, 1989).

Nesse trabalho foram feitas avaliações clínicas para verificar a extensão do movimento dentário nos animais sujeitos ou não à administração de diazepam. Apesar dos níveis de AMP cíclico nas células do ligamento periodontal não terem sido mensurados, as significativas alterações morfológicas celulares que ocorreram no grupo **experimental** podem ser decorrentes do mecanismo de ação farmacológica do diazepam que inibe a enzima fosfodiesterase, permitindo a manutenção da concentração elevada desse nucleotídeo nas células dos tecidos periodontais, mesmo após a ativação celular

inicial (PECK, CARPENTER e MESSINGER, 1974; DALTON, CROWLEY e SHEPPARD, 1974; SHANFELD, JONES, LASTER *et al.*, 1986). Esses resultados associados aos obtidos por YAMASAKI (1983) e SHANFELD e colaboradores (1986), segundo os quais os nucleotídeos cíclicos podem atuar como mediadores do ciclo da absorção óssea em resposta aos estímulos mecânicos ou químicos, constituem possível explicação para a maior extensão do movimento dentário encontrada nessa pesquisa.

7 CONCLUSÃO

7.1 Nos animais do grupo **experimental**, submetidos à administração de diazepam, a taxa do movimento dentário no 14º dia foi aferida em 5,61 mm e em 3,30 mm no grupo **placebo**, representando um aumento de 70% na referida taxa.

7.2 Os resultados histológicos obtidos mostraram:

7.2.1 através da ML, absorção óssea frontal em ambos os grupos submetidos à movimentação dentária e presença de alterações teciduais no grupo **experimental**, caracterizada por absorção óssea acelerada no lado de pressão, acentuada angiogênese e vasodilatação, enquanto no lado de tração houve desagregação das fibras colágenas, além de diminuição da extensão da aposição óssea, favorecendo o alargamento do espaço do ligamento periodontal;

7.2.2 no grupo **experimental**, os resultados histológicos obtidos através da MET evidenciaram vários graus de destruição tecidual

caracterizados por danos celulares, alterações na morfologia das fibras colágenas e infiltração de macrófagos;

7.2.3 as observações ultraestruturais realizadas no grupo **experimental** sugerem que o diazepam causa desorganização na arquitetura e morfologia do ligamento periodontal pelo rompimento dos feixes de fibras colágenas e diminuição de sua síntese devido aos danos causados nos fibroblastos;

7.2.4 a formação óssea foi nitidamente prejudicada nos animais do grupo **experimental** e o aspecto ultraestrutural dos osteoblastos foi caracterizado pelo aumento no volume mitocondrial, por distorções e desaparecimento das cristas mitocondriais, além do alargamento de sacos endoplasmáticos;

7.2.5 o diazepam interferiu no mecanismo de absorção óssea acelerando a atividade osteoclástica e promovendo efeito direto na ultraestrutura e tamanho dos osteoclastos, com aumento na largura e profundidade dos prolongamentos citoplasmáticos da borda em escova, além de organelas bem desenvolvidas e em grande atividade.

7.3 Os resultados histológicos obtidos através da MEV mostraram que o grupo **experimental** apresentou padrão de absorção radicular mais agressivo que o grupo **placebo**, porém com indícios de reparo quatorze dias após a aplicação da força.

8 RECOMENDAÇÕES

Uma vez que os ansiolíticos e os anticonvulsivantes constituem uma classe de medicamentos bastante utilizados nos dias atuais e que apresentam efeitos no metabolismo ósseo e do cálcio, deve-se dar continuidade aos estudos para que se possa conhecer mais detalhadamente os efeitos do diazepam na recidiva, na mobilidade dentária e na absorção radicular. Recomenda-se em caso de pacientes usuários destas drogas:

- a) o uso de forças leves e intermitentes associados a intervalos mais longos de ativação dos aparelhos ortodônticos, a fim de evitar o aparecimento de zonas hialinizadas e permitir a reorganização tecidual;
- b) acompanhamento radiográfico, em intervalos menores de tempo, para verificar presença de absorções radiculares;
- c) aumentar o tempo de contenção após o tratamento ortodôntico reduzindo os riscos de recidiva, e

d) tratamento cauteloso em pacientes com história prévia de doença periodontal ou portadores de pouca inserção óssea, a fim de evitar-se o agravamento da perda óssea.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, A., CANYÜREK, U., KOCAAGA, M. *et al.* Continuous vs. discontinuous force application and root resorption. **Angle Orthod.**, v. 69, n. 2, p. 159-164, Feb., 1999.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, cap. 15, p. 721-787.

ANDRADE, E. D. **Terapêutica medicamentosa em odontologia**. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 1999, cap. 6, p. 39-43.

ANDREASEN, J. O. Cementum repair after apicectomy in humans. **Acta Odontol. Scand.**, v. 31, n. 4, p. 211-221, Apr., 1973.

ASSENDER, J. W., SOUTHGATE, K. M., HALLETT, M. B. *et al.* Inhibition of proliferation, but not of Ca^{2+} mobilization, by camp and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. **Biochem. J.**, v. 288, p. 527-532, Dec., 1992.

AUBIN, J. B. The role of cytoskeleton and cell adhesion in the periodontal ligament during tooth movement. NORTON, L. A., BURSTONE, C.J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 13, p. 201-226.

BAKER, D. E. J., LINDSEY, J. R. e WEISBROTH, S. H. Housing to control research variables. In: BAKER, D. E. J., LINDSEY, J. R. e WEISBROTH, S. H., editors. **The laboratory rat: biology and diseases**. New York: Academic Press, v. 1, 1979, p. 169-192.

BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento de distúrbios psiquiátricos. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G. e LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. São Paulo: Interamericana, 1996, cap. 18, pág. 254-287.

BARBER, A. F. e SIMS, M. R. Rapid maxillary expansion and external root resorption in man: a SEM study. **Am. J. Orthod.**, v. 79, n. 6, p. 630-652, June, 1981.

BARDIN, P. G., DORWARD, M. A., LAMPE, F. C. *et al.* Effect of selective phosphodiesterase 3 inhibition on the early and late asthmatic responses to inhaled allergen. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, n. N. 4, p. 387-391, Apr., 1998.

BARNHILL, J. G., CIRAULO, D. A., GREENBLATT, D. J. *et al.* Benzodiazepine response and receptor binding after chronic ethanol in a mouse model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, n. 3, p. 812-819, Mar., 1991.

BARON, R., NEFF, L., LOUVARD, D. *et al.* Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. **J. Cell Biol.**, v.101, n. 12, p. 2210-2222, Dec., 1985.

BARON, R., NEFF, L., TRAN VAN, P. *et al.* Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. **Am. J. Pathol.**, v. 122, n. 2, p. 363-378, Feb., 1986.

BARON, R., NEFF, L., BROWN, W. *et al.* Polarized secretion of lysosomal enzymes: Co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. **J. Cell Biol.**, v. 106, n. 6, p. 1863-1872, June, 1988.

BARON, R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. **Anat. Rec.**, v. 224, n. 6, p. 317-324, Jun., 1989.

BASDRA, E. e KOMPOSCH, G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. **Eur. J. Orthod.**, v. 19, n. 6, p. 615-621, Dec., 1997.

BAUMRIND, S. A reconsideration of the propriety of the pressure-tension hypothesis. **Am. J. Orthod.**, v. 55, n. 1, p. 12-22, Jan., 1969.

BEER, B., CHASIN, M., CLODY, D. E. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety. **Science**, v. 176, n. 4033, p. 428-430, Apr., 1972.

BERESFORD, J. N., JOYNER, C. J., DEVLIN, C. *et al.* The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. **Archs. Oral Biol.**, v. 39, n. 11, p. 941-947, Nov., 1994.

BERKOVITZ, B. K. B. e SHORE, R. C. High mitochondrial density within peripheral nerve fibres of the periodontal ligament of rat incisor. **Archs. Oral Biol.**, v. 23, n. 3, p. 207-213, Mar., 1978.

BERNICK, S. Innervation of the teeth and periodontium. **Dent. Clin. North. Am.**, p.503-514, July, 1959.

BERTOLAMI, C. N. e BRONSON, R. E. Molecular mechanisms of tissue repair. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 8, p. 131-149.

BEVELANDER, G. e NAKAHARA, H. The fine structure of the human periodontal ligament. **Anat. Rec.**, v. 162, n. 3, p. 313-326, Nov., 1968.

BHASKAR, S. N. **Histologia e embriologia oral de Orban**. 10^a ed., São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda., 1989, cap. 7, p. 217-252.

BIEN, S. M. Fluid dynamic mechanisms and tooth movement. **Adv. Oral Biol.**, n. 2, p. 173-201, Oct., 1966.

BLAIR, H. C., KAHN, A. J., CROUCH, E.C. *et al.* Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. **J. Cell Biol.**, v. 102, n. 4, p.1164-1172, Apr., 1986.

BOEKENOOGEN, D. I., SINHA, P. K., NANDA, R. S. *et al.* The effects of exogenous prostaglandin E₂ on root resorption in rats. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 109, n. 3, p.277-286, Mar., 1996.

BOOTH, B. A. e UITTO, J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 675, n. 1, p. 117-122, Jun., 1981.

BÖTTING, P. S. e STOREY, E. Bone changes associated with the application of very low forces to incisor teeth in the guinea pig. **Aust. Dent. J.**, v. 18, p. 240-245, Aug., 1973.

BREZNIAK, N. e WASSERSTEIN, A. Root resorption after orthodontic treatment: part 1. Literature review. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 103, n. 1, p. 62-66, Jan., 1993 a.

_____ Root resorption after orthodontic treatment: part 2. Literature review. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 103, n. 2, p. 138-146, Feb., 1993 b.

BRONCKERS, A. L. J. J. A histological and biochemical study of the effect of vitamin C-deficiency on induction of amelogenesis in hamsters molars in vitro. **Archs. Oral Biol.**, v. 28 n. 8, p. 981-692, Aug., 1983.

BROOKER, G. THOMAS, L. J. e APPLEMAN, M. M. The assay of adenosine 3' 5' - cyclic monophosphate in biological materials by enzymatic radioisotopic displacement. **Biochem.**, v. 7, n. 12, p. 4177-4181, Dec., 1968.

BRUDVIK, P. e RYGH, P. Root resorption after local injection of prostaglandin E₂ during experimental tooth movement. **Eur. J. Orthod.**, v. 13, n. 4, p. 255-263, Aug., 1991.

_____ The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. **Eur. J. Orthod.**, v. 15, n. 4, p. 249-263, Aug., 1993 a.

_____ Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. **Eur. J. Orthod.**, v. 15, n. 6, p. 467-480, Dec., 1993 b.

_____ Root resorption beneath the main hyalinized zone. **Eur. J. Orthod.**, v. 16, n. 4, p. 249-263, Aug., 1994 a.

_____ Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. **Eur. J. Orthod.**, v. 16, n. 4, p. 265-273, Aug., 1994 b.

_____ Transition and determinants of orthodontic root resorption repair sequence. **Eur. J. Orthod.**, v. 17, p. 177-188, 1995.

BUMANN, A., CARVALHO, R. S., SCHWARZER, C. L. *et al.* Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. **Eur. J. Orthod.**, v. 19, n. 1, p. 29-37, Jan., 1997.

BURGER, E. H., VAN DER MEER, VAN DE GEVEL *et al.* In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v. 156, n. 12, p. 1064-1614, Dec., 1982.

BURR, D. B. e MARTIN, R. B. Errors in bone remodeling: toward a unified theory of metabolic bone disease. **Am. J. Anat.**, v. 186, n. 2, p. 186-216, Oct., 1989.

BURROW, S. J., SAMMON, P. J. e TUNCAY, O. C. Effects of diazepam on orthodontic tooth movement and alveolar bone camp levels in cats. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 90, n. 2, p. 102-105, Aug.,1986.

BURSTONE, C. J. e GOLDBERG, A. J. Beta titanium: a new orthodontic alloy. **Am. J. Orthod.**, v. 77, n. 3, p. 121-133, Sept., 1980.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa: CCAC, 1984, v. 1.

CARANO, A. e SICILIANI, G. Effects of continuous and intermitent forces on human fibroblasts in vitro. **Eur. J. Orthod.**, v. 18, n. 1, p. 19-26, Feb., 1996.

CARNEIRO, J. e MORAES, F. F. Radioautographic visualization of collagen metabolism in periodontal tissues of the mouse. **Archs. Oral Biol.**, v. 10, n. 8, p.833-845, 1965.

CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica de Glickman**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1983, 968 p.

CARVALHO, R. S., BUMANN, A., SCHWARZER, C. *et al.* Molecular mechanism of integrin regulation from bone cells stimulated by orthodontic forces. **Eur. J. Orthod.**, v. 18, n. 3, p. 227-235, June, 1996.

CECAL - CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. **Criação e produção de animais de laboratório**. Rio de Janeiro: CECAL-FIOCRUZ, 1998, 306p.

CHAMBERS, T. J., McSHEEHY, P. M. J., THOMPSON B. M. *et al.* The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. **Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 234-239, Jan., 1985.

CHAMBERS, T. J. e FULLER, K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoblastic contact. **J. Cell Sci.**, v. 76, n. 6, p. 155-165, June, 1985.

CHEUNG, W. Y. Cyclic 3',5' nucleotide phosphodiesterase. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, vol. 38, n. 3, p. 533-538, Mar., 1970.

CHO, M. I. e GARANT, P. R. An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse. I. Normal fibroblasts. **Anat. Rec.**, v. 201, n. 4 p. 577-586, Dec., 1981.

_____ Development and general structure of the periodontium. In BARTOLD, P. M., editor: v. 24. **Periodontology 2000**. Copenhagen: Munksgaard, 2000, p. 9-27.

CHUMBLEY, A. B. e TUNCAY, O. C. The effect of indomethacin (an aspirin- like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. and Dentofacial Orthop.**, v. 89, n. 4, p.312-314, Apr., 1986.

CIANCO, S. C., NEIDERS, M. E. e HAZEN, S. P. The principal fibers of the periodontal ligament. **Periodontics**, v. 5, p. 76-80, 1967.

COLLINS, M. K. e SINCLAIR, P. M. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 94, n. 4, p. 278-284, Oct., 1988.

DALTON, C., CROWLEY, H.J., SHEPPARD, H. *et al.* Regional cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in cat Central Nervous System: Effects of benzodiazepines. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 145, n. 2, p. 407-410, Feb., 1974.

DAVIDOVITCH, Z. e SHANFELD, J. Cyclic AMP levels in alveolar bone of orthodontically treated cats. **Archs. Oral Biol.**, v. 20, n. 9, p. 567-574, 1975.

DAVIDOVITCH, Z., FINKELSON, M.D., STEIGMAN, S. *et al.* Electric currents, bone remodeling and orthodontic tooth movement – I, II. **Am. J. Orthod.**, v. 77, n. 1, p. 14-47, Jan., 1980.

DAVIDOVITCH, Z., NICOLAY, O. F., NGAN, P. W. *et al.* Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. **Dent. Clin. North Am.**, v.32, n. 3, p. 411-435, July, 1988.

DEANGELIS, V. Observations on the response of alveolar bone to orthodontic force. **Am. J. Orthod.**, v. 58, n. 3, p. 284-294, Sept., 1970.

DELAISSÉ, J.M., EECKHOUT, Y., NEFF, L. *et al.* (Pro)collagenase is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. **J. Cell.Sci.**, v.106, p. 1071-1082, Dec., 1993.

DELIVANIS, H. P. e SAUER, G. J. R. Incidence of canal calcification in the orthodontic patient. **Am. J. Orthod.**, v. 82, n. 1, p. 58-61, Jul., 1982.

DEPORTER, D. A. e TEN CATE, A. R. Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. **J. Anat.**, v. 114, p. 457-461, 1973.

DIAZ, E. A. Periodontal ligament collagen response to tooth movement: Histochemical and autoradiographic reactions. **Am. J. Orthod.**, v. 73, n. 4, p. 443-458, Apr., 1978.

DIETRICH, J. W., CANALIS, E. M., MAINA, D. M. *et al.* Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro. Effects of parathyroid hormone and calcitonin. **Endocrinology**, v. 98, n. 4, p. 943-949, Apr., 1976.

DIVOLL, M., GREENBLATT, D. J., OCHS, H. R. *et al.* Absolute bioavailability of oral and intramuscular diazepam. **Anesth. Analg.**, v. 62, n. 1, p. 1-8, Jan., 1983.

DOMON, S., SHIMOKAWA, H., MATSUMOTO, Y. *et al.* In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. **Archs. Oral Biol.**, v. 44, n. 11, p. 907-915, Nov., 1999.

DOMON, T. e WAKITA, M. Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear osteoclast of the mouse. **Am. J. Anat.**, v. 192, n. 1, p. 35-44, Sept., 1991.

DUDLEY, H. R. e SPIRO, D. The fine structure of bone cells. **J. Biophysic. and Biochem. Citol.**, v. 11, p. 627-649, Nov., 1961.

EDWARDS, J. G. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. **Am. J. Orthod.**, v. 54, n. 6, p. 441-461, June, 1968.

EECKHOUT, Y. Possible role and mechanism of action of dissolved calcium in the degradation of bone collagen by lysosomal cathepsins and collagenase. **Biochem. J.**, v. 272, n. 2, p. 529-532, Dec., 1990.

ENLOW, D. H. **Crescimento facial**. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 1993, c. 2, p. 57-144.

EVERTS, V., DELAISSÉ, J. M., KORPER, W. *et al.* Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. **J. Cell. Physiol.**, v. 150, n. 2, p. 221-231, Feb., 1992.

FISHMAN, D. A. e HAY, E. Origin of the osteoclast from regenerating new limbs. **Anat. Rec.**, v. 143, n. 2, p. 329-334, Oct., 1962.

FORWOOD, M. R., KELLY, W. L. e WORTH, N. F. Localisation of prostaglandin endoperoxidase H synthase (PGHS)-1 AND PGHS-2 in bone following mechanical loading in vivo. **Anat. Rec.**, v. 252, n. 4, p. 580-586, Dec., 1998.

FREILICH, L. S. ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoclasts: effect of parathyroid extract. **J. Dent. Res.**, v. 50, p. 1047-1055, 1971.

FREITAS, L. **Radiologia bucal. Técnicas e interpretação.** São Paulo: Pancast Editora, 1992. p. 73-75.

FROEHLICH, J. E. e RACHMELER, M. Effect of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate on cell proliferation. **J. Cell Biol.**, v. 55, n. 1, p. 19-31, Jan., 1972.

FUKUDA, M. e TAZAKI, M. Distribution of organized sensory nerve endings in the human periodontal ligament. **Bull Tokyo. Dent. Coll.**, v. 35, n. 3, p. 133-137, Aug., 1994.

FURSETH, R., SELVIG, K. e MJÖR, I. A. O periodonto. In MJÖR, I. A. e FEJERSKOV, O. **Embriologia e histologia oral humana.** São Paulo: Editora Panamericana, 1990, cap. 5, p. 131-176.

FURSTMAN, L. e BERNICK, S. Clinical considerations of the periodontium. **Am. J. Orthod.**, v. 61, n. 2, p. 138-155, Feb., 1972.

GARANT, P. R. Collagen resorption by fibroblasts. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. **J. Periodontol.**, v. 47, n. 7, p. 380-390, July, 1976.

GARANT, P. R. e CHO, M. I. Cytoplasmic polarization of periodontal ligament fibroblasts. Implications for cell migration and collagen secretion. **J. Periodontal Res.**, v. 14, n. 2, p. 95-98, Mar., 1979 a.

_____ Autoradiographic evidence of the coordination of the genesis of Sharpey's fibers with new bone formation in the periodontium of the mouse. **J. Periodontal Res.**, v. 14, n. 2, p. 107, Mar., 1979 b.

_____. Fibroblast migration, cytoplasmatic polarity and matrix secretion in the periodontal ligament. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 3, p. 29-53.

GIANELLY, A. A. Force-induced changes in the vascularity of the periodontal ligament. **Am. J. Orthod.**, v. 55, n. 1, p. 5-11, Jan., 1969.

GIANELLY, A. A. e SCHNUR, R. M. The use of parathyroid hormone to assist orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 55, n. 3, p. 305, Mar., 1969.

GIANELLY, A. A. e GOLDMAN, H. M. **Biologic basis of orthodontics**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971.

GIUNTA, D., KELLER, J., NIELSEN, F. F. *et al.* Influence of indomethacin on bone turnover. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 108, n. 4, p. 361-366, Oct., 1995.

GOLDIE, R. S. e KING, G. J. Root resorption and tooth movement in ortodontically treated calcium-deficient and lactating rats. **Am. J. Orthod.**, v. 85, n.5, p. 424-430, May, 1984.

GONZALES, F. e KARNOVSKY, M. Eletron microscopy of osteoclasts in healing fractures of rat bone. **J. Biophysic. and Biochem. Citol.**, v. 9, p. 299-316, Sept., 1961.

GOODSON, J. M., McCLATGHY, K. e REVELL, C. Prostaglandin-induced resorption of the adult rat calvarium **J. Dent. Res.**, vol. 53, n. 3, p. 670-677, May-Jun, 1974.

GORDON, S. Biology of the macrophage. **J. Cell Sci.**, v. 4, p. 267-286, 1986.

GOTO, T., TSUKUBA, T., AYASAKA, N. *et al.* Immunocytochemical localization of cathepsin D in the rat osteoclast. **Histochem.**, v. 97, n. 1, p. 13-18, Jan., 1992.

GOULD, T. R. L., MELCHER, A. H. e BRUNETTE, D. M. Localization of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. **Anat. Rec.**, v. 188, p.133-137, 1977.

GOULD, T. R. L. Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 8, p. 873-876, Aug., 1983

GRIEVE, W. G., JOHNSON, G. K., MOORE, R. N. *et al.* Prostaglandin E and interleukin-1 β levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 105, n. 4, p. 369-374, Apr., 1994.

GRONOWICZ, G. A. e MCCARTHY, M. Glucocorticoids inhibit the attachment of osteoblasts to bone extracellular matrix proteins and decrease beta₁-integrin levels. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 598-608, Feb., 1995.

GROTENDORST, G. R., SEPPÄ, H. E., KLEINMANN, H. K. *et al.* Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration towards platelet-derived growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 7, p. 3669-3672, Jul., 1981.

HADDAD, A., SESSO, A., ATTIAS, M. *et al.* **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Editor: Wanderley de Souza – Rio de janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 179p.

HAFFNER, J. F. W., MORLAND, J., SETEKLEIV, J. *et al.* Mental and psychomotor effects of diazepam. **Acta Pharmacol. et Toxicol.**, v. 32, p. 161-178, 1973.

HALL, B. K. Cellular differentiation in skeletal tissues. **Biol. Rev.**, v. 45, n. 4, p. 455-484, Nov., 1970.

HAHN, T. J., BIRGE, S. J., SCHARP, C. R. *et al.* Phenobarbital-induced alterations in Vitamin D metabolism. **J. Clin. Invest.**, v. 51, n. 4, p. 741-748, April, 1972.

HAHN, T. J., HENDIN, B. A. e SCHARP, C. R. Serum 25-hydroxycalciferol levels and bone mass in children on chronic anticonvulsant therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 292, n. 3, p.550-554, Mar., 1975.

HAMBERG, M. e SAMUELSSON, B. On the metabolism of prostaglandins E₁ and E₂ in the guinea pig. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3495-3502, June, 1972.

HANCOX, N. M. e BOOTHROYD, B. Motion picture and electron microscope studies on the embryonic avian osteoclast. **J. Biophysic. and Biochem. Citol.**, v. 11, p.651-666, Nov., 1961.

HARADA, S., NAGY, J. A., SULLIVAN, K. A *et al.* Induction of vascular endotelial growth factor expresion by Prostaglandin E₂ and E₁ in osteoblast. **J. Clin. Invest.**, v.93, n. 6, p. 2490-2496, June, 1994.

HARRY, M. R. e SIMS, M. R. Root resorption in bicuspid intrusion: a SEM study. **Angle Orthod.**, v. 52, p. 235-258, 1982.

HARTER, L. V., HRUSKA, K. A. e DUNCAN, R. L. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 528-535, 1995.

HELLER, I. J. e NANDA, R. *Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 75, n. 3, p. 239-257, Mar., 1979.

HERMAN, R. J. e WILKINSON, G. R. Disposition of diazepam in young and elderly subjects after acute and chronic dosing. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 42, n. 2, p. 147-155, Aug., 1996.

HICKHAM, J. H. Directional force revisited. **J. Clin. Orthod.**, v. 27, n. 9, p. 626-637, Sept., 1986.

HILLESTAD, L. HANSEN, T. MELSON, H. *et al.* Diazepam metabolism in normal man - I, II. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 16, n. 3, p. 4479-489, 1974.

HOLTROP, M. E., RAISZ, L. Y. e SIMMONS, H. A. The effects of parathyroid hormone, colchicine and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. **J. Cell Biol.**, v. 60, n. 2, p. 346-355, Feb., 1974.

HOROWITZ, M. C., COLEMAN, D. L., FLOOD, P. M. *et al.* Parathyroid hormone and lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 1, p. 149-157, Jan., 1989.

HUGHES, B. e KING, G.J. Effect of orthodontic appliance reactivation during the peak expansion in the osteoclast population. **Anat. Rec.**, v. 251, n. 5, p. 80-86, May, 1998.

HUNT, A. M. e PAYNTER, K. J. The effects of ascorbic acid deficiency in the teeth and periodontal tissues of guinea pigs. **J. Dent. Res.**, v. 38, p. 232, 1959.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 2, p. 549-54, Feb., 1987.

IGARASHI, K., ADACHI, H., MITANI, H. *et al.* Inhibitory effect of the topical administration of a biphosphonate on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 9, p. 1644-1649, Sept., 1996.

INSEL, P. A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G. e LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. São Paulo: Interamericana, 1996, cap. 27, p. 450-479.

JILKA, R. L. e COHN, D. V. Role of phosphodiesterase in parathormone-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate response in bone cell populations enriched in osteoclasts and osteoblasts. **Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 743-747, Mar., 1981.

JIMI, E., SHUTO, T. e KOGA, T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 α maintain the survival of osteoclast-like cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 808-811, Feb., 1995.

JOHNSTON, C. S. e HUANG, S. Effect of ascorbic acid nutriture on blood histamine and neutrophil chemotaxis in guinea pigs. **J. Nutr.**, v. 121, n.1, p.126-130, Jan., 1991.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 260 p.

KALEY, J. e PHILLIPS, C. Factors related to root resorption in edgewise practice. **Angle Orthod.**, v. 61, n. 2, p. 125-132, Feb., 1991.

KALLIO, D. M., GARANT, P. R. e MINKIN, C. Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 39, n. 3-4, p.295-216, 1972.

KAMAKURA, S., SASANO, Y., HOMMA-OHKI, H. *et al.* Multinucleated giant cells recruited by implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat bone marrow share ultrastructural characteristics with osteoclasts. **J. Eletron Microsc.**, v. 46, n. 5, p. 397-403, May, 1997.

KAMEDA, T., MIYAZAWA, K., MORI, Y. *et al.* Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.220, p. 515-519, Mar., 1996.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137-142, 1965.

KATZHENDER, E. e STEIGMAN, S. Effect of repeated orthodontic treatment on the dental and periodontal tissues of the rat incisor. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 116, n. 6, p. 642-650, Dec., 1999.

KAWAHARA, I. e TAKANO, Y. Segregated localization of immunocompetent cells and osteoclasts in the periodontal ligament of the rat molar. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 58, n. 3, p. 345-355, Mar., 1995.

KEELING, S. D., KING, G. J., McCOY, E. *et al.* Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 103, n. 4, p. 320-326, Apr., 1993.

KEHOE, M. J., COHEN, S. M., ZARRINNIA, K. *et al.* The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E₂ synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. **The Angle Orthod.**, n. 5, p. 339-49, Sept-Oct., 1996.

KIM, T. W., YOSHIDA, Y., YOKOYA, K. *et al.* An ultrastructural study of bisphosphonate administration on osteoclastic bone resorption during relapse of experimentally moved rat molars. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 115, n. 6, p. 645-653, June, 1999.

KING, G. J., ARCHER, L. e ZHOU, D. Later orthodontic appliance reactivation stimulates immediate appearance of osteoclasts and linear tooth movement. **Am. J. Orthod. and Dentofacial Orthop.**, v. 114, n. 6, p. 692-697, Dec., 1999.

KING, G. J. e HOLTROP, M. E. Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by binding to heavy meromyosin. **J. Cell Biol.**, v. 66, n. 2, p. 445-451, May, 1975.

KING, G. J. e THIEMS, S. Chemical mediation of bone resorption induced by tooth movement in rats. **Archs. Oral Biol.**, v. 24, n. 10/11, p. 811-815, 1979.

KING, G. J. e COURTS, F. Humoral immune response to active root resorption. In NORTON, L. A., BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 18, p. 275-285.

_____ Humoral immune response to active root resorption with a murine model. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 98, n. 5, p. 456-462, May, 1990.

KING, G. J., KEELING, S. D. e WRONSKI, T. J. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. **Bone**, v.12, p.401-409, 1991

KLEIN, D. C. e RAISZ, L. G. Stimulation of bone resorption in tissue culture. **Endocrinology**, v. 86, p. 1436-1440, June, 1970.

_____ Role of AMPc in the hormonal regulation of bone resorption. **Endocrinology**, v. 89, p. 818-826, Sept., 1971.

KOBAYASHI, Y., TAKAGI, H., SAKAI, H. *et al.* Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement. **Angle Orthod.**, v. 68, n. 3, p. 259-266, Mar., 1998.

KOIDE, M., OKAHASHI, N., TANAKA, R. *et al.* Inhibition of experimental bone resorption and osteoclast formation and survival by 2-aminoethanesulphonic acid. **Archs. Oral Biol.**, v. 44, n. 9, p. 711-719, 1999.

KOUMAS, H. e MATHEWS, J. L. Effect of pressure on the formation of collagen in the periodontal ligament. **Am. J. Orthod.**, v. 56, n. 6, p. 604-612, Dec., 1969.

KRÁMER, G. M., FILLIOS, L. C. e BOWLER, E. C. Ascorbic acid treatment on early collagen production and wound in the guinea pig. **J. Periodontol.** v. 50, n. 4, p. 189-192, Apr., 1979.

KRAW, A. G. e ENLOW, D. H. Continuous attachment of the periodontal membrane. **Am. J. Anat.**, v. 120, n. 1, p. 133-148, Jan., 1967.

KREAM, B.E., ROWE, D. V., GWOREK, S. C. *et al.* parathyroid hormone alters collagen synthesis and procollagen mRNA levels in fetal rat calvaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 10, p. 5654-5658, Oct., 1980.

KROON, D. B. The bone-destroying function of the osteoclasts (Koelliker's brush border). **Acta Anat.**, v. 21, n. 1, p. 1-18, Jan., 1954.

KURIHARA, N., SUDA, T., MIURA, Y. *et al.* Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1295-1302, Sept., 1989.

KURIHARA, S. e ENLOW, D. H. An electron microscopic study of attachments between periodontal fibers and bone during alveolar remodeling. **Am. J. Orthod.**, v. 77, n. 5, p.516-531, May, 1980 a.

_____ A histochemical and electron microscopic study of an adhesive type of collagen attachment on resorptive surfaces of alveolar bone. **Am. J. Orthod.**, v. 77, n. 5, p. 532-5546, May, 1980 b.

LACEY, D., GROSSO, L. E., MOSER, S. A. *et al.* IL-1-induced murine osteoblast IL-6 production is mediated by the type 1 IL-1 receptor and is increased by 1,25 Dihydroxyvitamin D3. **J. Clin. Invest.**, v. 91, n. 4, p. 1731-1742, Apr., 1993.

LANGFORD, S. R. e SIMS, M. R. Root resorption, repair and periodontal attachment following rapid maxillary expansion in man. **Am. J. Orthod.**, v. 81, n. 2, p.108-115, Feb., 1982.

LASFARGUES, J. J. e SAFFAR, J. L. Inhibition of prostanoid synthesis depress alveolar bone resorption but enhances root resorption in the rat. **Anat. Rec.**, v.237, n.4, p. 458-465, Dec., 1993.

LEE W. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement with particular emphasis on the relationship to the method of PGE1 administration. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 98, n. 3, p. 231-241, Sept., 1990.

LEE, R. Y., ARTUN, J. e ALONZO, T. A. Are dental anomalies risk factors of apical root resorption in orthodontic patients. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 116, n. 2, p.187-195, Feb., 1999.

LEFORT, J. e VARGAFTIG, B. B. Role of platelets in aspirin sensitive broncoconstriction in the guinea-pig; interactions with salicylic acid. **Br. J. Pharmac.**, v. 63, n. 1, p. 35-42, May, 1978.

LILJA, E., LINDSKOG, S. e HAMMARSTRÖM, L. Histochemistry of enzymes associated with tissue degradation incident to orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 83, n. 1, p. 62-75, Jan., 1983.

LIN, Y. e GRINNEL, F. Decreased level of PDGF-stimulated receptor by fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 122, n. 3, p. 663-672, Aug., 1993.

LINDHE, J., KARRING, T. e LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999, cap. 1, p.3-42.

LINDSKOG, S., BLOMLÖF, L. e HAMMARSTRÖM, L. Cellular colonization of denuded root surfaces in vivo: cell morphology in dentin resorption and cementum repair. **J.Clin. Periodontol.**, v. 14, p. 390-395, 1987 a.

_____. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. **J.Clin. Periodontol.**, v. 14, p. 386-389, 1987 b

LINTTON, S. F. Tooth movement during ascorbic acid deficiency. **Am. J. Orthod.**, v.65, n. 3, p. 290-302, Mar., 1974.

LIVINGSTON, S., BERMAN, W. e PAULI, L. L. Anticonvulsivant drugs and vitamin D metabolism. **JAMA**, v. 24, n. 12, p. 1634-1635, June, 1973.

LUPI, J. E., HANDELMAN, C. S. e SADOWSKY, C. Prevalence and severity of apical root resorption and alveolar bone loss in orthodontically treated adults. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 109, n. 1, p. 28-37, Jan., 1996.

LORENZO, J. A., SOUZA, S. L., FONSECA, J. M. *et al.* Colony-stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 80, p. 160-164, July, 1987.

MACAPANPAN, L. C., WEINMANN, J. P. e BRODIE, A. G. Early tissue changes following tooth movement in rats. **Angle Orthod.**, v. 2, n. 2, p. 79-95, Apr., 1954.

MAEDA, T., SATO, O., KOBAYASHI, S. *et al.* The ultrastructure of Ruffini endings in the periodontal ligament of rat incisors with special reference to the terminal Schwann cells (k-cells) **Anat. Rec.**, v. 223, p. 95-103, 1989.

MAJESKA, R. J., RYABY, J. T. e EINHORN, T. A. Direct modulation of osteoblastica activity with estrogen. **J. Bone Joint Surg.**, v. 76, n. 5, p. 713-721, May, 1994.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A., GAY, S. e MILLER, E. J. Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. **J. Cell Biol.**, v. 29, p. 343-349, 1982.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, cap.10: Técnicas anestésicas de laboratório.

MATSUDA, N., KUMAR, N. M., RAMAKRISHNAN *et al.* Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*. **Archs. Oral Biol.**, v. 38, n. 7, p. 559-569, 1993.

MATSUDA, N., YOKOYAMA, K., TAKESHITA, S. *et al.* Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. **Archs. Oral. Biol.**, v. 43, n. 12, p. 987-997, 1998.

McCULLOCH, C. A. G. e MELCHER, A. H. Cell density and cell generation in the periodontal ligament. **Am. J. Anat.**, v. 167, n. 1, p. 43-58, May, 1983.

McCULLOCH, C. A. G. e BORDIN S. Role of fibroblast subpopulations in the periodontal physiology and pathology. **J. Periodont. Res.**, v. 26, p. 144-154, 1991.

McCULLOCH, C. A. G., LEKIC, P. e McKEE, M. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. In Bartold, P. M., editor: v.24. **Periodontology 2000**. Copenhagen: Munksgaard, 2000, p. 56-72.

McDONALD, F. Electrical effects at bone surface. **Eur. J. Orthod.**, v. 15, n. 5, p. 175-183, May, 1993.

McNAB, S., BATTISTUTA, D., TAVERNE, A. *et al.* External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 116, n. 5, p. 545-551, May, 1999.

McSHEEHY, P. M. J. e CHAMBERS, T. J. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. **Endocrinology**, v. 118, n. 2 p. 824-828, Feb., 1986.

MEGHJI, S. Bone remodelling. **Br. Dent. J.**, v. 172, n. 6, p. 235-242, Mar., 1992.

MENDIETA, C. F., REEVE, C. M. e ROMERO, J. C. Biosynthesis of prostaglandins in gingiva of patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.** v. 56, n. 1, p. 44-47, Jan., 1985.

MICHALANY, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. 3ª ed. Editora Michalany Ltda., 1998, 295p.

MIDGETT, R. J., SHAYE, R. e FRUGE, J. F. The effect of altered bone metabolism on orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 80, n. 3, p. 256-262, Sept., 1981.

MILLER, S. C., BOWMAN, B. M., SMITH, J. M. *et al.* Characterization of endosteal bone lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. **Anat. Rec.**, v. 198, n. 2, p. 163-173, Oct., 1980.

MILLER, S. C. e JEE, W. S. S. The effect of dichloromethylene diphosphonate, a pyrophosphate analog, on bone and bone cell structure in the growing rat. **Anat. Rec.**, v. 193, n. 3, p. 439-462, Mar., 1979.

MIYAJIMA, K., ITO, R., MATSUYAMA, T. *et al.* Morphological differences in the skull of ascorbic acid-deficient ods rats. **Archs. Oral Biol.**, v. 40, n. 4, p. 293-297, 1995.

MIYAUCHI, A. ALVAREZ, J., GREENFIELD, E. M. *et al.* Recognition of osteopontina and related peptides by $\alpha_v\beta_3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 20369-20374, 1991.

MOHAMMED, A. H., TATAKIS, D. N. e DZIAK, R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 95, n. 3, p. 231-237, Mar., 1989.

MORIMOTO, Y.I., YAMAGUCHI, K. e TANNE, K. Influence of dietary n-3 polysaturated fatty acid on experimental tooth movement in rats. **Angle Orthod.**, v. 69, n. 4, p. 365-371, Aug., 1999.

MORISHITA, M., YAMAMURA, T., BACHCHU *et al.* The effects of oestrogen on osteocalcina production by human periodontal ligament cells. **Archs. Oral Biol.**, v. 43, n. 4, p. 329-333, 1998.

MORISHITA, M., SHIMAZU, A. e IWAMOTO, Y. Analysis of oestrogen receptor mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in human periodontal ligament cells. **Archs. Oral Biol.**, v. 44, n. 9, p. 781-783, 1999.

MUNDY, G. R., ALTMAN, J. A., GONDEK, M. D. *et al.* Direct resorption by human monocytes. **Science**, v. 196, n. 3, p. 1109-1111, June, 1977

MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J. Period. Res.**, v. 2, n. 3, p. 213-217, Feb., 1991.

_____ **Bone remodeling and its disorders.** 2^a ed. Londres: Martin Dunitz, 1999, 263 p.

MURAD, S., GROVE, D., LINDBERG, K. A. *et al.* Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 5, p. 2879-2882, May, 1981.

NAITO, M. Macrophage heterogeneity indevelopment and differentiation. **Arch. Histol. Cytolo.**, v. 56, n. 4, p. 331-351, Oct., 1993.

NG, K. T., KING, G. J. e COURTS, F. J. Humoral immune response to active root resorption with a murine model. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 98, n. 5, p. 456-462, Nov., 1990.

NIJWEIDE, P. J., BURGER, E. H. e FEYEN, J. H. M. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. **Physiol. Rev.**, v. 66, n. 4, p. 855-885, Oct., 1986.

NOREVALL, L.I., FORSGREN, S. e MATSSON, L. Expression of neuropeptides during and after orthodontic tooth movement in the rat. **Eur. J. Orthod.**, v. 17, n. 8, p. 311-325, Aug., 1995.

NORMAN, A. W. The mode of action of vitamin D. **Biol. Rev.**, v. 43, n. 1, p. 97-137, Feb., 1968.

OGAWARA, M., AOKI, K., OKIJI, T. *et al.* Effect of ascorbic acid deficiency on primary and reparative dentinogenesis in non-ascorbate-synthesizing ods rats. **Archs. Oral Biol.**, v. 42, n. 10 p. 695-704, 1997.

OKAHASHI, N. NAKAMURA, I., JIMI, E. *et al.* Specific inhibitors of vacuolar H⁺ ATPase trigger apoptotic cell death of osteoclast. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p.1116-1123, 1997.

ORLOWSKI, W. A. Biochemical study of collagen turn over in rat incisor periodontal ligament. **Archs. Oral. Biol.**, v. 23, n. 12, p. 1163-1165, 1978.

OZAWA, H., IMAMURA, K., ABE, E. *et al.* Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v.147, p.177-185, 1990.

PARAKKAL, P. F. Involvement of macrophages in collagen resorption. **J. Cell Biol.**, v.41, p. 345-354, 1964.

PARFITT, A. M. Plasma calcium control at quiescent bone surfaces: A new approach to the homeostatic function of bone lining cells. **Bone**, v. 8, p. 51-58, 1987.

PAYNTER, K. J. e PUDY, G. A study of the structure, chemical nature and development of cementum in the rat. **Anat. Rec.**, v. 131, n. 2, p. 233-251, June, 1958.

PECK, W. A., CARPENTER, J. e MESSINGER, K. Cyclic 3', 5' – adenosine monophosphate in isolated bone cells. II. Responses to adenosine and parathyroid hormone. **Endocrinology**, v. 94, n. 1, p. 148-154, Jan., 1974.

PENTO, J. T., GLICK, S. M. e KAGAN, A. Diphenylhydantoin inhibition of calcitonin secretion in the pig. **Endocrinology**, v. 92, n. 1, p. 330-333, Jan., 1973.

PETERKOFISKY, B. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 152, p. 318-328, 1972.

PIEZ, K. A. Cross-linking of collagen and elastin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 37, p.547-570, 1968.

PHILLIPS, J. R. Apical root resorption under orthodontic therapy. **Angle Orthod.**, v.25, n. 1, p. 1-22, Jan., 1955.

PICKLES, V. R. The prostaglandins. **Bio. Rev.**, v.42, n. 4, p. 614-652, Apr., 1967.

PROCKOP, D. J., KIVIRIKKO, K. I., TUDERMAN, L. *et al.* The biosynthesis of collagen and its disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 301, n. 1, p. 13-24, July, 1979.

PROFFIT, W. R. As bases biológicas da terapia ortodôntica. In: PROFFIT, W. R. e FIELDS, H. W. **Ortodontia contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 9, p. 244-264.

RALL, T. W. Hipnóticos e sedativos; Etanol. In: JOEL G. HARDMAN, ALFRED G. GILMAN e LEE E. LIMBIRD. **As bases farmacológicas da terapêutica**. São Paulo: Interamericana, 1996, cap. 17, p. 228-252.

RALL, T. W. SCHLEIFER, L. S. Drogas eficazes no tratamento das epilepsias. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G. e LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. São Paulo: Interamericana, 1996, cap. 19, p. 288-304.

RAY, W., GRIFFIN, M. e DOWNEY, W. Benzodiazepines of long and short elimination half-life and the risk of hip fracture. **JAMA**, v. 262, n. 23, p. 3303-3307, 1989.

REINHOLT, F. P., HULTENBY, K., OLDBERG, A., *et al.* Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 4473-4475, 1990.

REITAN, K. Initial tissue behaviour during apical root resorption. **Angle Orthod.**, v.44, n. 1, p. 68-82, Jan., 1974.

REITAN, K. e RYGH, P. Princípios e reações biomecânicas. In: GRABER, T. M. e VANARSDALL, R. L., editors. **Princípios e técnicas atuais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 2, p. 88-174.

RICHENS, A. e ROWE, D. J. F. Disturbance of calcium metabolism by anticonvulsivant drugs. **Br. Med. J.**, v. 4, n. 10, p.73-76, Oct., 1970.

RIFKIN, B. e HEIJL, L. The occurrence of mononuclear cells at sites of osteoblástica bone resorption in experimental periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 50, n. 12, p. 636-640, Dec., 1979.

ROBERTS, W. E. e JEE, W. S. S. Cell kinetics of orthodontically stimulated and non-stimulated periodontal ligament in the rat. **Archs. Oral. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 17-21, 1974.

ROBERTS, W. E. e CHASE, D. C. Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically induced osteogenesis. **J. Dent. Res.**, v. 60, n. 2, p. 174-181, Feb., 1981.

ROBERTS, W. E., GOODWIN, W. C. e HEINER, S. R. Cellular response to orthodontic force. **Dent. Clin. North Am.**, v. 25, n. 1, p. 3-17, Jan., 1981.

ROBERTS, W. E., MOZSARY, P. G. e KLINGER, E. Nuclear size as a cell-kinetic marker for osteoblast differentiation. **Amer. J. Anat.**, v. 165, n. 4, p. 373-384, Dec., 1982.

ROBERTS, W. E. e FERGUSON, D. J. Cell kinetics of the periodontal ligament. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 4, p. 55-70.

ROBERTS, W. E. Biomecânica, metabolismo e fisiologia óssea na prática ortodôntica. In: GRABER, T. M. e VANARSDALL, R. L., editors. **Princípios e técnicas atuais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 3, p. 175-212.

ROBINSON, P. B., ROWE, D. J. F. e HARRIS, M. The effects of diphenylhydantoin and vitamin D deficiency on developing teeth in the rat. **Archs. Oral Biol.**, v. 23, n. 3, p. 137-143, 1978.

RODAN, G. A., BOURRET, L. A., HARVEY, A. *et al.* Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects of bone remodeling. **Science**, v. 189, p. 467-469, Aug., 1975.

RODAN, S. B. e RODAN, G. A. The effect of parathyroid hormone and tyrocalcitonin on the accumulation of cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate in freshly isolated bone cells. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 10, p. 3068-3074, May, 1974.

RODAN, G. A. e MARTIN, T. J. Role os osteoblasts in hormonal control os bone resorption – a hypothesis. **Calcif. Tissue Int.**, v. 33, p. 349-351, 1981.

ROSS, M. e ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, cap. 8, p. 141-179: Osso.

ROSS, R. The fibroblast and wound repair. **Biol. Rev.**, v. 43, n. 1, p.51-96, Feb., 1968.

RYGH, P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. **Acta Odontol. Scand.**, v.30, n.5, p.575-593, Nov., 1972.

_____ Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement: **Acta Odontol. Scand.**, v. 31, n. 2, p.109-122, Sept., 1973.

_____ Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. **Angle Orthod.**, v. 47, n. 1, p. 1-16, Jan., 1977.

_____ The periodontal ligament under stress. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 2, p. 9-28.

SAHARA, N., ASHIZAWA, Y., NAKAMURA, K. *et al.* Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. **Anat. Rec.**, v. 252, n. 2, p. 215-228, Oct., 1998.

SAITO, M., SAITO, S., NGAN, P. W. *et al.* Interleukin-1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 99, n. 3, p. 226-240, Mar., 1991.

SANDY, J. R., FARNDAL, R. W. e MEIKLE, M. C. Recent advances in mechanically induced bone remodeling. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v.103, n. 3 p. 212-222, Mar., 1993.

SASAKI, T., MOTEGI, N., SUZUKI, H. *et al.* Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. **Am. J. Anat.**, v.183, p.303-315, 1988.

SASAKI, T. e MATSUDA, E. M. Cystein-proteinase localization in osteoclasts - an immunocytochemical study. **Cell Tissue Res.**, v. 271, p. 177-179, 1993.

SCHWARTZ, M. A., KOECHLIN, B. A., POSTMA, E. *et al.* metabolism of diazepam in rat, dog and man. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 149, n. 3, p. 423-435, Mar., 1965.

SCHEIJMANS, C. M. J., DIEUDONNÉ, S. C. e ANDERSEN, B. P. The influence of transforming growth factor β 1 on the development of embryonic mouse long bones. **Eur. J. Orthod.**, v. 18, n. 3, p. 237-243, Jun., 1996.

SCOTT, B. L. Thymidine H3 electron microscope radioautography of osteogenic cells in the fetal rat. **J. Cell Biol.**, v. 35, n. 1, p. 115-126, Jul., 1967.

SELVIG, K. A. An ultrastructural study of cementum formation. **Acta Odont. Scand.**, v. 22, n. 1, p.105-120, Apr. 1964.

_____ The fine structure of human cementum. **Acta Odont. Scand.**, v. 23, n. 4, p.423-430, Aug., 1965.

SHANFELD, J., JONES J., LASTER, L. *et al.* Biochemical aspects of orthodontic movement I: cyclic nucleotide and prostaglandin concentrations in tissues surrounding orthodontically treated teeth in vivo. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 90, n. 2, p.139-148, Aug., 1986.

SHEWEMI, S., SHAMMARY, F., ZAMEL, F. *et al.* Ultrastructure of resting and rh-GMCSF-treated human macrophages derived from blood monocytes. **J. Electron Microsc.**, v. 45, n. 5, p. 388-394, Oct., 1996.

SICHER, H. e DUBRUL, E. L. **Anatomia bucal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977, 511p.

SILVA, J. B. **Biossegurança em experimentação animal: um enfoque microbiológico**. 1ª ed. Rio de Janeiro.CICT/MULTIMEIOS/FIOCRUZ, 1998.

SILVER, I. A., MURRILLS, R. J. e ETHERINGTON, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. **Experim. Cell Res.**, v. 175, n. 2, p. 266-276, Apr., 1988.

SIQUEIRA, J. F. e DANTAS, C. J. S. **Inflamação**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 190p.

SISMANIDOU, C., HILLIGES, M. e LINDSKOG, S. Healing of the root surface-associated periodontium: an immunohistochemical study of orthodontic root resorption in man. **Eur. J. Orthod.**, v. 18, n. 5, p. 435-444, Oct., 1996.

SODEK, J. Collagen turnover in periodontal ligament. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 10, p. 158-181.

SODEK, J. e McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. In BARTOLD, P. M., editor: v. 24. **Periodontology 2000**. Copenhagen: Munksgaard, 2000, p. 99-126.

SOMERMAN, M. J., YOUNG, M. F., MOEHRING, M. *et al.* Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. **Archs. Oral. Biol.**, v. 35, n. 3, p. 241-247, 1990.

SOMJEN, D., BINDERMAN, I., BERGER, E. *et al.* Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E2 mediated. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 627, n. 1, p.91–100, Jan., 1980.

STEVENINCK, A. L., WALLNÖFER, A. E., SCHOEMAKER, R. C. *et al.* A study of the effects of long-term use on individual sensitivity to temazepam and lorazepam in a clinical population. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, p. 267-275, 1997.

STOREY, E. e SMITH, R. Force in orthodontics and its relation to tooth movement. **Aust. J. Dent.**, v .56, p. 11–18, 1952.

STOREY, E. Bone changes associated with tooth movement. A histological study of the effect of force in the rabbit, guinea pig and rat. **Aust. J. Dent.** v. 59, p. 147-151, 1955.

_____ Tissue response to the movement of bones. **Am. J. Orthod.**.. v.64, n.3, Sept., 1973.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 881p.

SUTTON, J. S. e WEISS, L. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epitheloid cells and multinucleated giant cells. An electron microscope study. **J. Cell Biol.**, v. 28, p. 303-307, 1966.

SUTHERLAND, E. W. e RALL, T. W. The relation of adenosine-3'5'-phosphatase and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. **Pharmacol. Rev.**, v. 12, p. 265-299, 1960.

TAKAGAKI, Y. M., SUZUKI, Y., KAWASE, T. *et al.* Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p.2028-2035, 1996.

TAM, C. S., HEERSCHE, J. N. M., MURRAY, T. M. *et al.* Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action. **Endocrinology**, v. 110,n. 2, p. 506-512, Feb., 1982.

TANAKA, S., HAJI, M., TAKAYANAGI, R. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for aromatase cytochrome P450 synergistically, with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1860-1869, May, 1996.

TANAKA, T., MORIOKA, T., AYASAKA, N. *et al.* Endocytosis in odontoclasts and osteoclasts using microperoxidase as a tracer. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 3, p.883-889, Mar., 1990.

TANZER, M. L., CHURCH, R. L., YAEGER, J. A. *et al.* Procollagen: Intermediate forms containing several types of peptide chains and non-collagen peptide extensions at NH₂ and COOH ends. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, n. 8, p. 3009-3112, Aug., 1974.

TANZER, M. L. What is collagen ? In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 9, p. 151-155.

TAVERNE, A. A. R., LEMMENS, I. G. e TONINO, G. J. M. Lathyrogens and the role of collagen in the eruption of rat incisors. **Archs. Oral Biol.**, v. 31, n. 2, p. 127, 1986.

TEN CATE, A. R. **Oral histology: development, structure and function** St.Louis: Mosby, 1994, cap.7: Hard tissue formation and destruction.

TEN CATE, A. R. e DEPORTER, D. A. The degradative role of the fibroblast in the remodeling and turnover of collagen in soft connective tissue. **Anat. Rec.**, v. 182, n. 1, p. 1-14, May, 1975.

THOMPSON, J. W. e APPLEMAN, M., M. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. **Biochem.**, v. 10, n. 2, p. 311-316, Feb., 1971.

TRAN VAN, P., VIGNERY, A. e BARON, R. Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. **Anat. Rec.**, v. 202, n. 4, p. 445-451, Apr., 1982.

TSAY, P. T., CHEN, M. C. e OYEN, O. J. Osteoclast activation and recruitment after application of orthodontic force. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 115, n.3, p. 323-331, Mar., 1999.

TYER, B. H., GIANELLY, A. A. e RUBENS, M. P. Cellular dynamics and orthodontic tooth movement, **Am. J. Orthod.**, v. 54, n. 7, p. 515-520, July, 1968.

UEDA, N., NISHIHARA, T., ISHIHARA, Y. *et al.* Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 69-75, Jan., 1995.

UEMATSU, S., MOGI, M. e DEGUCHI, T. IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth Factor and β_2 microglobulin levels are elevated in gingival crevicular

fluid during human orthodontic tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 1, p. 562-567, Jan., 1996.

UTLEY, R. K. The activity of alveolar bone incident to orthodontic tooth movement as studied by oxytetracycline-induced fluorescence. **Am. J. Orthod.**, n. 3, p. 167-201, Mar., 1968.

VAES, G. Cellular biology and biochemical mechanisms of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. **Clin. Orthop.**, v. 231, p. 239-271, 1988.

VÄÄNÄNEN, H. K., KARHUKORPI, E. K., SUNDQUIST, K. *et al.* Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺ - ATPase type in the ruffled border of osteoclasts. **J. Cell Biol.**, v. 111, n. 9, p.1305-1311, Sept., 1990.

VAN DE VELDE, J. P., KUITERT, R. B., VAN GINKEL, F. C. *et al.* Histologic reactions in gingival and alveolar tissues during tooth movement in rabbits. **Eur. J. Orthod.**, v.10, n. 4, p. 296-308, Nov., 1988.

VERNILLO, A. T. e RIFKIN, B. R. Effects of tetracyclines on bone metabolism. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 56-62, Nov., 1998.

VIGNERY, A. e BARON, R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. **Anat. Rec.**, v. 196, n. 2, p. 191-200, Feb., 1980.

WAINRIGHT, W. Facialingual tooth movement: its influence on the root and cortical plate. **Am. J. Orthod.**, v. 64, n. 3, p. 278-302, Sept., 1973.

WAN, J., XIA, H., HE, N. *et al.* The elimination of diazepam in Chinese subjects is dependent on the mephenytoin oxidation phenotype. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 42, n.4, p.471-474, Oct., 1996.

WANNMACHER L. e FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 37, p. 265-269.

WATERS, N. E., HOUSTON, W. J. B. e STEPHENS C. D. The characterization of arch wires for the initial alignment of irregular teeth. **Am. J. Orthod.**, n. 4, p.373-389, Apr., 1981.

WILLMER, E. N. Steroids and cell surface. **Biol. Rev.**, v. 36, n. 3, p. 368-398, Aug., 1961.

YAMAGUCHI, M., SHIMIZU, N., GOSEKI, T., *et al.* Effect of different magnitude of tension force on prostaglandin E₂ production by human periodontal ligament cells. **Archs. Oral. Biol.**, v. 39, n. 10, p. 877-884, 1994.

YAMAGUCHI, M., SHIMIZU, N., SHIBATA, Y., *et al.* Effect on different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 3, p. 889-894, Mar., 1996.

YAMASAKI, K., MIURA, F. e SUDA, T. Prostaglandins as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. **J. Dent. Res.**, v. 59, n. 10, p. 1635-1642, Oct., 1980.

YAMASAKI, K., SHIBASAKI, Y. e FUKUHARA, T. Behaviour of mast cells in PDL associated with experimental tooth movement in rats. **J. Dent. Res.**, v. 61, n. 12, p.447-50, Dec., 1982.

YAMASAKI, K. The role of cyclic AMP, calcium and prostaglandins in the induction of osteoclastic bone resorption associated with experimental tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 8, p. 877-881, Aug., 1983.

YAMASAKI, K., SHIBATA, Y. IMAI, S. *et al.* Clinical application of prostaglandin E₁ upon orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 85, n.6, p.508-518, Jun., 1984.

YAMASAKI, K. Pharmacological control of tooth movement. In NORTON, L. A. e BURSTONE, C. J., editors: **The biology of tooth movement**. Boca Raton: CRC Press, 1989, c. 19, p. 287-320.

YAMASHITA, Y., SATO, M. e NOGUCHI, T. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. **Archs. Oral Biol.**, v. 32, n. 9, p. 677-678, 1987.

YAMAUCHI, C., FUJITA, S., OBARA, T. *et al.* Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intake, and hematology in rats. **Lab. Anim. Sci.**, v. 31, n. 3, p. 251-258, June, 1981.

YAMAUCHI, M., KATZ, E. P. e MECHANIC, G. L. Intermolecular crosslinking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. **Biochem.**, v. 25, n. 17, p. 4907-4911, Aug., 1986.

YEE, J. Response of periodontal ligament cells to orthodontics forces; ultrastructural identification of proliferating fibroblasts. **Anat. Rec.**, v. 194, n. 4, p. 603-607, Aug., 1979.

YOKOYA, K., SASAKI, T. e SHIBASAKI, Y. Distributional changes of osteoclasts and pre-osteoclastic cells in periodontal tissues during experimental tooth movement as revealed by quantitative immunohistochemistry of H⁺-ATPase. **J. Dent. Res.**, v. 76, n.1, p. 580-587, Jan., 1997.

ZWARYCH, P. D. The intermediate plexus of the periodontal ligament: History and further observations. **J. Dent. Res.**, v. 44, p. 383-391, 1965.